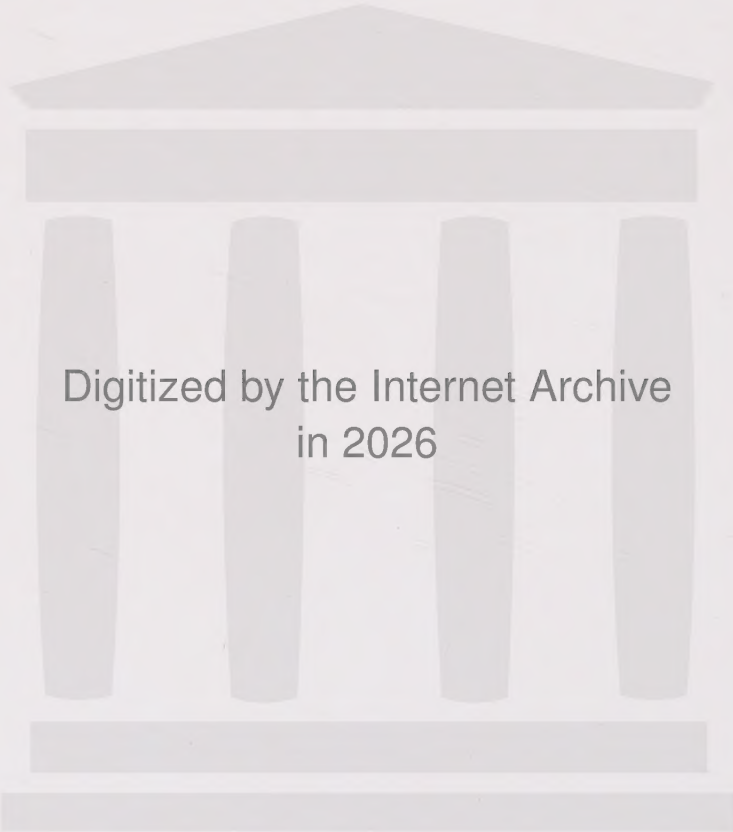


DIE ENZYMATISCHE BESTIMMUNG DER VERZWEIGTKETTIGEN AMINOSÄUREN IM SERUM

METHODIK UND ANWENDUNG

Hans-Joachim Rudolph

1980



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549007_0031

Aus dem Klinisch Chemischen Institut des Städt.Krankenhauses
München Schwabing

Direktor: Prof. Dr. med. Otto Wieland

DIE ENZYMATISCHE BESTIMMUNG DER
VERZWEIGTKETTIGEN AMINOSÄUREN IM SERUM
METHODIK UND ANWENDUNG

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Hans-Joachim Rudolph
aus Schweinfurt

Jahr
1980

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. O. Wieland
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. H. Mehnert
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 21.10.1980



Meinem Vater

Meiner Mutter

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	1
II. Methodischer Teil	
A Präparation der Leucin Aminotransferase (LAT) aus Schweineherz	4
B Bestimmung der verzweigtkettigen Aminosäuren im Serum	11
C Standardisierung des Meßverfahrens	18
III. Anwendung der Methode	
A Ermittlung von Normalwerten	23
B Verhalten der verzweigtkettigen Serum- aminosäuren beim Fasten	28
C Verhalten der verzweigtkettigen Serum- aminosäuren bei verschiedenen Erkrankungen	41
IV. Zusammenfassung	55
V. Literaturverzeichnis	56
VI. Danksagung	
VII. Lebenslauf	

Verwendete Abkürzungen

für Enzyme

ALAT	Alanin Aminotransferase
ASAT	Aspartat Aminotransferase
GLDH	Glutamatdehydrogenase
LAT	Leucin Aminotransferase

für Substrate

ADP	Adenosin-diphosphat
α -KG	α -Ketoglutarat
APAD	Acetylpyridin-adenin-dinucleotid
AS	Aminosäuren
BZ	Blutzucker
FGX	Fructose : Glucose : Xylit im Verhältnis 2 : 1 : 1
Ile	Isoleucin
Leu	Leucin
Val	Valin
VKAS	verzweigtkettige Aminosäuren

I. Einleitung

Jede lebende Zelle benötigt die verzweigtkettigen Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin zur Proteinbiosynthese (58). Für den Menschen sind sie essentiell (59). Daraus ergibt sich ihre Bedeutung für die enterale und parenterale Ernährung Gesunder und Kranker.

Der Abbau der verzweigtkettigen Aminosäuren (VKAS) vollzieht sich beim Menschen vorwiegend in der Muskulatur und im Gehirn (22).

Ihre Aminogruppen werden in den Muskelgeweben durch die in Abbildung 1 wiedergegebenen Transaminierungsreaktionen auf Pyruvat übertragen und so dem Glucose-Alanin-Cyclus zugeführt (siehe Abbildung 2) (52). Andere Aminosäuren bleiben als Stickstoff-Quelle der muskulären Alanin-Synthese bedeutungslos (22, 52).

Bei gesteigertem Abbau von Muskelprotein ergeben sich charakteristische Veränderungen der Serumkonzentrationen der VKAS (1, 16); Verlaufskontrollen eignen sich, unter bestimmten Voraussetzungen, zur Beurteilung des Erfolgs von therapeutischen Maßnahmen zur Verringerung des Katabolismus (64).

Der Hirnstoffwechsel der VKAS ist noch weitgehend unerforscht (7, 11). Seine Bedeutung wird jedoch ersichtlich

aus der Tatsache, daß die VKAS von allen Aminosäuren die größten arterio-venösen Differenzen über dem cerebralen Gefäßbett aufweisen (20).

Am Transportsystem der Blut-Hirn-Schranke für neutrale Aminosäuren konkurrieren die VKAS kompetitiv u.a. mit Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan, Precursor-Aminosäuren der Neurotransmitter Dopamin und Noradrenalin bzw. Serotonin (25, 55, 81). Dadurch vermindern sie den Transmittergehalt katecholaminerger und serotoninerger Neuronenpopulationen (25, 32, 33, 66, 81).

Auf dieser Grundlage konnte ein neues therapeutisches Konzept entwickelt und erfolgreich erprobt werden (27, 28, 29, 63) (siehe Seite 54).

Die quantitative Bestimmung der VKAS in Körperflüssigkeiten erforderte bisher eine zeit- und arbeitsaufwendige Auftrennung der Aminosäuren durch Papierchromatographie, Dünnschichtchromatographie oder Ionenaustauschchromatographie (58). Wir entwickelten einen schnell und leicht durchführbaren enzymatischen Test zur unmittelbaren Konzentrationsbestimmung der verzweigtkettigen Serumaminosäuren.

Das Testprinzip ist teilweise identisch mit der in Abbildung 1 wiedergegebenen Reaktionskette; die Alanin Amino-transferase (EC 2.6.1.2.) wurde jedoch ersetzt durch die Glutamatdehydrogenase (EC 1.4.1.3.); als Protonen-Acceptor diente Acetylpyridin-adenin-dinucleotid.

Die Präparation der Leucin Aminotransferase, sowie die Beschreibung, Standardisierung und Anwendung des Meßverfahrens werden in Kapitel II und III dargestellt.

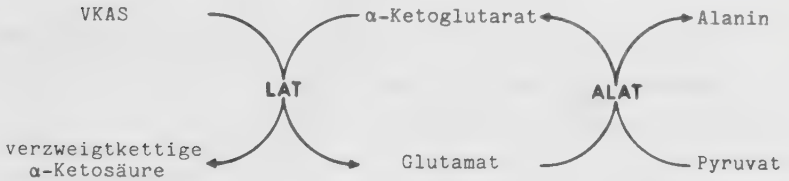


Abbildung 1 : Übertragung der Aminogruppen von verzweigt-kettigen Aminosäuren auf Pyruvat (52).

LAT:Leucin Aminotransferase; ALAT:Alanin Aminotransferase.

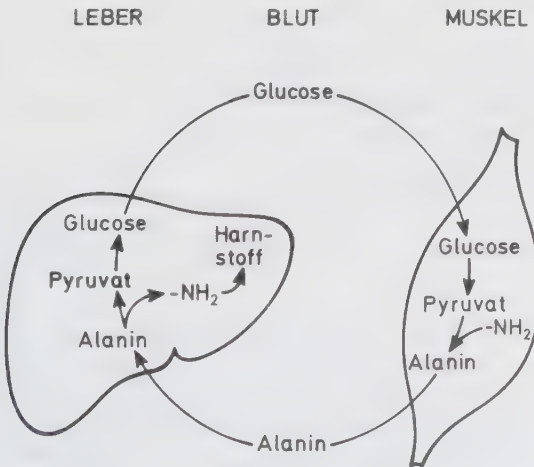


Abbildung 2 : Der Glucose - Alanin - Cyclus
(mod. nach Felig (21)).

II. Methodischer Teil

A Präparation der Leucin Aminotransferase (LAT) aus Schweineherz

Die Präparation der LAT (EC 2.6.1.6.) erfolgte nach einer Modifikation des von Taylor und Jenkins angegebenen Verfahrens (73).

Material und Methoden

Für die Reinigung des Enzyms wurden folgende Reagentien benötigt:

1 N Kalilauge,

Ammoniumsulfat,

α -Ketoglutarat (α -KG),

1 M Tris-Puffer, pH 11.2,

10 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7.6,

500 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7.6,

Medium A bestehend aus

5 mM Kaliumphosphat,

5 mM EDTA,

1 mM α -KG,

1 mM Glutathion,

1 mM Caproat,

pH 7.0,

Medium A' bestehend aus

Medium A,

zusätzlich noch

1.6 M Ammoniumsulfat,

biert. Dann wurden die Reaktionen beendet durch Zugabe von

1 ml 2,4 - Dinitrophenylhydrazin 15 mM.

Die Hydrazonbildung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur

(22 - 25°C) abgewartet.

Dann wurden 5 ml Cyclohexan, Merck Nr. 9666

zugesezt.

Es wurde tüchtig geschüttelt (20 Sekunden) und 2 Minuten

zentrifugiert.

Dann wurden 2 ml der oberen Phase und

1.5 ml Natriumcarbonat, 10 % ige Lösung

in Zentrifugengläser pipettiert.

Es wurde geschüttelt und 1/2 Minute zentrifugiert.

Dann wurden 1 ml der unteren Phase und

2 ml Natronlauge 1 N

in Küvetten (Schichtdicke 1 cm) pipettiert und gemischt.

Die Extinktionen wurden im Zeiss-Spektralphotometer bei

440 nm und 25°C gemessen.

Die Berechnung erfolgte nach der Formel:

$$\text{LAT - Volumenaktivität } \left[\frac{U}{\text{ml}} \right] = \frac{\Delta E \cdot F \cdot V}{v \cdot d \cdot t \cdot \epsilon_{\mu\text{mol}}} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{ml} \cdot \text{min}} \right]$$

Mit	ΔE	= Extinktion _{Probe} - Extinktion _{Leerwert}
	F	= 3.75 (Verdünnungsfaktor)
	V	= 3 ml (Testvolumen)
	v	= 0.02 - 0.40 ml (Probevolumen)
	d	= 1 cm (Schichtdicke)
	t	= 10 min (Reaktionszeit)
	$\epsilon_{\mu\text{mol}}$	= 1.43 $\frac{\text{cm}^2}{\mu\text{mol}}$ (mikromolarer Extinktionskoeffizient)

Protein wurde nach der Biuret-Methode oder (bei der Säulenchromatographie) durch fortlaufende Messung der Extinktion bei 280 nm bestimmt.

Reinigung des Enzyms

Extraktion

3.8 kg von Fett freipräpariertes Schweineherz wurden in Würfel geschnitten, durch einen Fleischwolf gedreht und mit 6 l Medium A 3 Minuten lang im Warring-Blendor homogenisiert. Das Homogenat wurde bei $+4^{\circ}\text{C}$ 2 Stunden gerührt und danach mit 175 ml Polyimin P vermischt. Das Gemisch wurde 10 Minuten gerührt und dann 30 Minuten bei 3500 x g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde mit Medium A nachextrahiert und nochmals bei 3500 x g zentrifugiert. Beide Überstände wurden vereinigt.

Hitzeaktivierung

Der Überstand wurde im Wasserbad unter kräftigem Rühren innerhalb von 15 Minuten auf $+63^{\circ}\text{C}$ erhitzt. Bei einer Temperatur von ca. $+40^{\circ}\text{C}$ wurde kristallines α -KG bis zu einer Endkonzentration von 10 mM zugegeben. Das Gemisch wurde 20 Minuten lang bei $+63^{\circ}\text{C}$ belassen, dann im Eisbad auf $+4^{\circ}\text{C}$ abgekühlt und anschließend bei 3500 x g zentrifugiert. Alle weiteren Schritte wurden bei einer Temperatur von 0 - $+5^{\circ}\text{C}$ ausgeführt.

Absorption an Calcium-Phosphat-Gel

Der Überstand wurde mit 33 Vol % Calcium-Phosphat-Gel ver-

mischt. Das Gemisch wurde 1 Stunde gerührt und dann 10 Minuten bei 1000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, der Niederschlag mit ca. 1.5 l Medium A gewaschen und bei 1000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals verworfen, der Niederschlag mit ca. 2.5 l Elutionspuffer 1 eine Stunde gerührt und 10 Minuten bei 1000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde als Eluat 1 gewonnen und kühl gelagert. Der Niederschlag wurde mit ca. 2.5 l Elutionspuffer 1 nachextrahiert und 10 Minuten bei 1000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Eluat 1 vereinigt.

Erste Ammoniumsulfat-Fällung

Eluat 1 wurde kristallines Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 2 M zugegeben. Nach 30 Minuten Rühren und Zentrifugation für 40 Minuten bei 3500 x g wurde der Niederschlag in ca. 600 ml Medium A gelöst. Unlösliches Material wurde nach nochmaliger Zentrifugation verworfen.

Zweite Ammoniumsulfat-Fällung

Die Lösung wurde durch Zugabe von Ammoniumsulfat auf eine Endkonzentration von 1.6 M gebracht, 30 Minuten lang gerührt und anschließend 30 Minuten bei 20000 x g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde mit Medium A' gewaschen, 10 Minuten bei 20000 x g zentrifugiert und dann in ca. 200 ml Medium A gelöst. Der pH der Lösung wurde mit 1 M Tris-Puffer auf 7.0 eingestellt und anschließend 3 mal für jeweils 4 Stunden gegen 10 l Medium A dialysiert. Entstandene Trübungen wurden abzentrifugiert.

DEAE - Sephadex - Chromatographie

Eine DEAE - Sephadex - A 50 - Säule (3 x 25 cm) wurde, nach Äquilibration des Gels in Medium A (pH mit 1 N KOH auf 8.6 eingestellt), gefüllt und dann mit ca. 1100 ml Elutionspuffer 2 äquilibriert. Das Dialysat wurde auf die DEAE - Sephadex - Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte über einen linearen Gradienten (2 x 500 ml Elutionspuffer 2) von 0 - 500 mM NaCl. Fraktionen zu 10 ml wurden gesammelt und Eluate mit hoher LAT-Aktivität vereinigt.

Dritte Ammoniumsulfat-Fällung

Die vereinigten Eluate wurden durch Zugabe von Ammoniumsulfat auf eine Endkonzentration von 1.8 M gebracht. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, in Medium B gelöst und 3 mal für jeweils 6 Stunden gegen 10 l Medium B dialysiert. Das Dialysat wurde 3 mal eingefroren und bei 25°C wieder aufgetaut. Trübungen wurden jeweils abzentrifugiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die LAT-Lösung bei -40°C gelagert.

Tabelle 1 faßt die Ergebnisse der Reinigung des Enzyms zusammen. Bei einer Ausbeute von 40 % wurde eine Anreicherung der spezifischen Aktivität um Faktor 33 erzielt.

Tabelle 1 : Präparation der Leucin Aminotransferase (LAT) aus Schweineherz

Fraktion	Volumen [ml]	Volumenaktivität [U/ml]	Ausbeute [%]	Proteingehalt [mgProtein/ml]	spez. Aktivität [U/mgProtein]
Rohextrakt nach Homogenisation	7000	4.1			
Überstand nach Polyimin P	7000	4.3		8.0	0.5
Extrakt nach Hitzeaktivierung	7000	6.2	100		
Eluat 1	5000	4.4	51		
Lösung nach 1. Ammo- niumsulfat-Fällung	610	44.6	63		
1. Dialysat	230	103.0	55	9.1	11.3
Eluat nach Chromatographie	140	123.0	40	8.5	14.5
2. Dialysat	80	218.0	40	13.2	16.5
LAT-Lösung vor der Lagerung bei -40°C	115	150.0	40		

B Bestimmung der verzweigtkettigen Aminosäuren im Serum

Materialien

2 N NaOH,

Triäthanolamin-HCl (Tra-HCl),

α -Ketoglutarat (α -KG),

Adenosin-diphosphat (ADP),

Acetylpyridin-adenin-dinucleotid (APAD),

Glutamatdehydrogenase (G1DH) in Glycerin gelöst, NH_4^+ -frei,

Leucin Aminotransferase (LAT).

Testprinzip

Das Meßverfahren ist angelegt als zusammengesetzter optischer Test mit Endpunktsbestimmung. In der Hauptreaktion katalysiert die LAT aufgrund ihrer Gruppenspezifität gegenüber verzweigtkettigen Aminosäuren die folgenden Reaktionen:

L-Leucin + α -KG $\xrightarrow{\text{LAT}}$ α -Ketoisocaproinsäure + Glutamat

L-Isoleucin + α -KG $\xrightarrow{\text{LAT}}$ α -Keto- β -Methylvalerians. + Glutamat

L-Valin + α -KG $\xrightarrow{\text{LAT}}$ α -Ketoisovaleriansäure + Glutamat

Die G1DH katalysiert die anschließende Indikatorreaktion:

Glutamat + $\text{APAD}^+ + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{G1DH}} \alpha\text{-KG} + \text{APADH} + \text{NH}_4^+$

Das entstandene APADH wird im Photometer bei 366 nm gemessen.

Verwendete Ausgangslösungen

50 mM Tra-HCl-Puffer, pH 8.5,

25 mM α -KG-Lösung (bei +4°C mindestens 4 Wochen haltbar),

15 mM APAD-Lösung (bei +4°C mindestens 1 Woche haltbar),

G1DH-Lösung 1200 U/ml, zusätzlich 1 mM ADP

(bei +4°C mindestens 1 Jahr haltbar),

LAT-Lösung 150 U/ml (bei +4°C mindestens 1 Tag haltbar).

Bestimmungsansatz für Serum

In Halbmikroküvetten aus Kunststoff (Schichtdicke 1 cm)

wurden folgende Volumina pipettiert:

Tabelle 2	Leerwert	Probe	Konzentration im Test
Tra-HCl-Puffer	500 μ l	500 μ l	40 mmol/l
α -KG-Lösung	10 μ l	10 μ l	0.4 mmol/l
APAD-Lösung	50 μ l	50 μ l	1.2 mmol/l
G1DH-Lösung	20 μ l	20 μ l	$3.8 \cdot 10^4$ U/l
LAT-Lösung	-	20 μ l	$4.8 \cdot 10^3$ U/l
Aqua dest.	20 μ l	-	-
Mischen			
Extinktion messen bei 366 nm	E_{OL}	E_{OP}	
Serum	25 μ l	25 μ l	
Mischen			

Meßtemperatur 25°C .

Die Extinktionszunahme wurde bei 366 nm im Eppendorf-Photometer mit Küvettenwechsel-Automatik, angeschlossen an einen Eppendorf-Extinktionsschreiber, verfolgt. 1 Stunde nach Serumzugabe wurden die Extinktionen von Leerwert (E_{1L}) und Probe (E_{1P}) gemessen. Abbildung 3 zeigt exemplarisch einen Extinktionsverlauf von Leerwert und Probe.

Berechnung

Es wurden die Extinktionsdifferenzen

$$\Delta E_{\text{Leerwert}} = E_{1L} - E_{OL} \quad \text{und}$$

$$\Delta E_{\text{Probe}} = E_{1P} - E_{OP} \quad \text{gebildet.}$$

Dann wurde die Extinktionsdifferenz des Leerwerts von der Extinktionsdifferenz der Probe subtrahiert:

$$\Delta E = \Delta E_{\text{Probe}} - \Delta E_{\text{Leerwert}}$$

Nach der allgemeinen Berechnungsformel für die Bestimmung der Konzentration gilt :

$$c = \frac{V}{\epsilon \cdot v \cdot d} \cdot \Delta E$$

Mit $V = 625 \mu\text{l}$ (Testvolumen)

$v = 25 \mu\text{l}$ (Probenvolumen)

$d = 1.0 \text{ cm}$ (Schichtdicke)

$\epsilon = 9.1 \frac{\text{cm}^2}{\mu\text{mol}}$ (mikromolarer Extinktionskoeffizient von APADH bei 366 nm)

Für die Konzentration der verzweigt-kettigen Aminosäuren im Serum ($[\text{VKAS}]_{\text{Serum}}$) ergibt sich:

$$[\text{VKAS}]_{\text{Serum}} = \frac{625}{9.1 \cdot 25 \cdot 1.0} \cdot \Delta E \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{ml}} \right] = 2.7473 \cdot \Delta E \left[\frac{\text{mmol}}{\text{l}} \right]$$

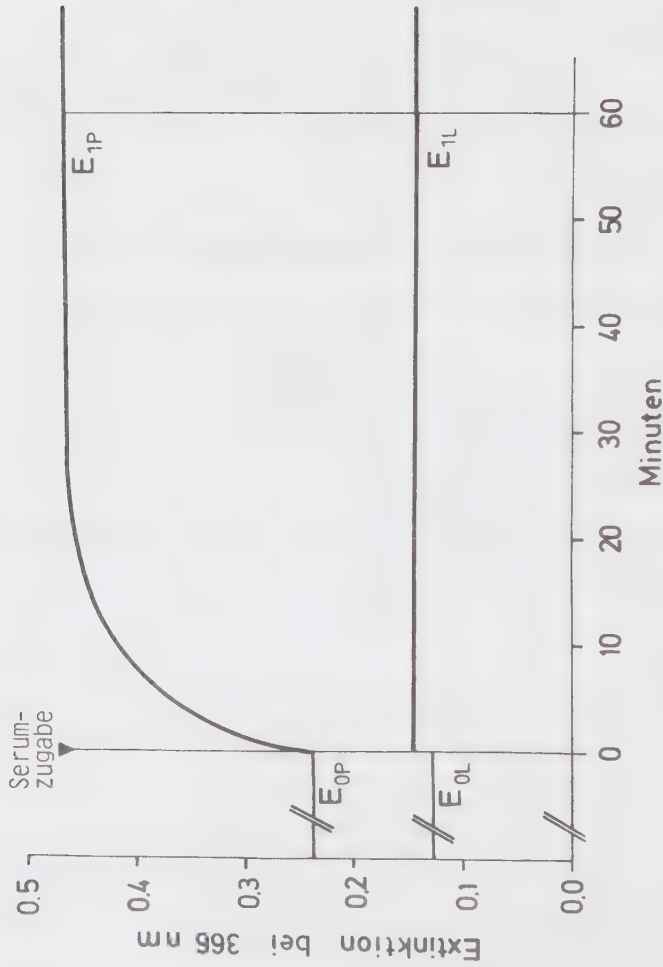


Abbildung 3 : Exemplarischer Extinktionsverlauf von Leerwert und Probe; E_{0L} , E_{1L} : Extinktion des Leerwerts vor bzw. 1 Stunde nach Serumzugabe; E_{0P} , E_{1P} : Extinktion der Probe vor bzw. 1 Stunde nach Serumzugabe.

Optimale Testbedingungen

Vorversuche zur Optimierung des Tests ergaben folgende Resultate:

Ammoniumionen

Das Gleichgewicht der Indikatorreaktion wird durch Ammoniumionen auf die Seite von Glutamat und APAD verschoben. Um dem entgegenzuwirken, müssen alle verwendeten Reagenzien möglichst frei sein von Ammoniumionen.

pH-Wert

Taylor und Jenkins geben als pH-Optimum der LAT bei Verwendung von Tris-Puffer pH 8.5 an (73). Dieser Wert konnte auch für das LAT-GLDH-Reaktionssystem bestätigt werden.

Puffer

In Tris-Puffer, pH 8.5 lief die Indikatorreaktion stark verzögert ab. Der für das Reaktionssystem günstigere Puffer ist Tra-HCl, pH 8.5 .

α -KG-Konzentration

Als optimaler Konzentrationsbereich für α -KG wurden 0.4 bis 0.5 mmol/l (in der Küvette) ermittelt. Niedrigere oder erheblich höhere α -KG-Konzentrationen verzögerten den Reaktionsablauf.

Stabilität der GLDH

Es zeigte sich, daß die Stabilität der handelsüblichen, NH_4^+ -freien GLDH-Lösungen schon bei 25°C unzureichend war. Durch Zusatz von 1 mM ADP zur handelsüblichen GLDH-Lösung

wurde ausreichende Stabilität erreicht.

LAT-Aktivität

LAT-Aktivitäten über 3 U/Test ($\hat{=}$ $4,8 \cdot 10^3$ U/l) konnten keine wesentliche Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit des LAT-G1DH-Systems bewirken.

APAD-Konzentration

Eine deutliche Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit konnte durch Erhöhung der APAD-Konzentration erzielt werden. Die in der Testbeschreibung angegebene APAD-Konzentration ist ein Kompromiß zwischen einer praktikablen Reaktionsdauer und einem vertretbaren Kostenaufwand.

C Standardisierung des Meßverfahrens

Präzision in Serie

Die mit einem Poolserum ermittelte Präzision in Serie ergab bei $n = 11$:

Mittelwert : $\bar{x} = 0.50$ mmol/l VKAS

Standardabweichung : $SD = 0.01$ mmol/l VKAS

Variationskoeffizient: $VK = 2.4 \%$

Präzision von Tag zu Tag

Die Präzision von Tag zu Tag wurde über eine Zeitspanne von 3 Monaten verfolgt. An jedem Arbeitstag im Labor wurden 100 μ l Poolserum aufgetaut und die VKAS bestimmt. Es ergaben sich folgende Werte:

$$n = 37$$

Mittelwert : $\bar{x} = 0.51$ mmol/l VKAS

Standardabweichung : $SD = 0.03$ mmol/l VKAS

Variationskoeffizient: $VK = 6.5 \%$

Die Meßergebnisse sind in Abbildung 4 dargestellt.

Wiederfindung

Die Konzentration der VKAS in menschlichem Serum, 1 : 1 verdünnt mit Aqua bidest., wurde durch Zugabe von Valin, Leucin und Isoleucin um die in Tabelle 3 angegebenen Beträge erhöht ($\Delta[VKAS]$).

Bei Erhöhung der Konzentration von Isoleucin, Leucin, Valin oder allen 3 VKAS um 0.13 - 0.52 mmol/l betrug die

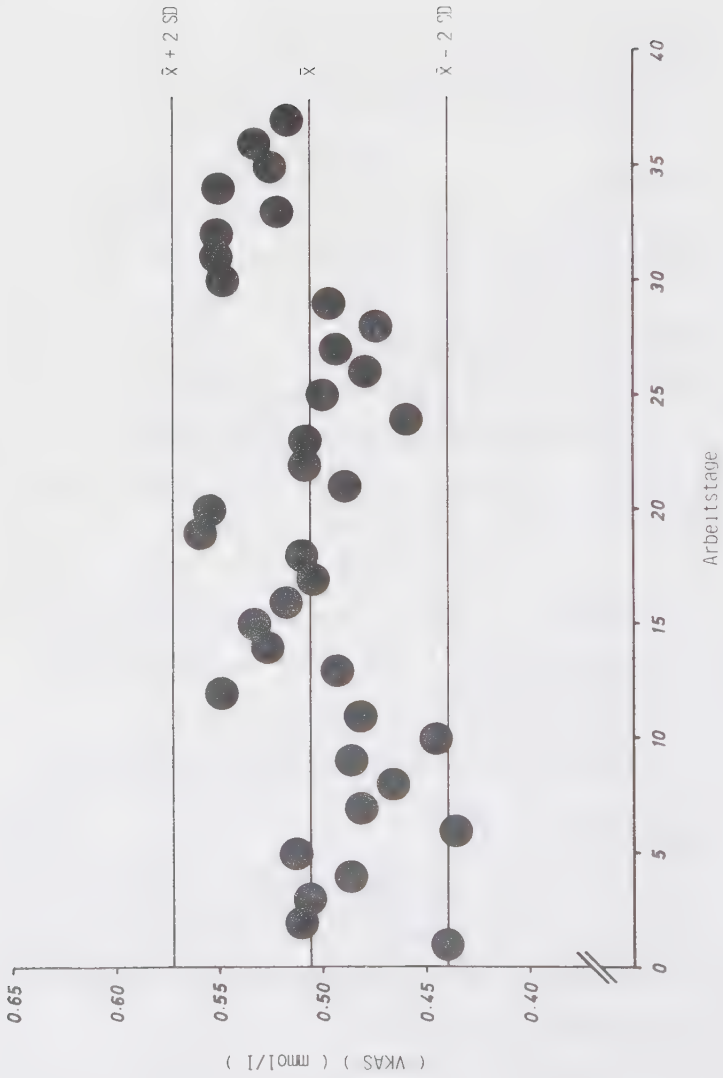


Abbildung 4 : Präzision von Tag zu Tag mit Poolserum.

Tabelle 3 : Wiederfindung der VKAS in Serum

Zugesetzte VKAS	Δ [VKAS] [mmol/l]	Meßwert [mmol/l]	mittlere Wiederfindung [%]
Ø	0	0.24 ± 0.02 (n = 5)	Ø
Isoleucin	0.15	0.40	106.5
"	0.23	0.46	97.8
"	0.31	0.56	103.9
"	0.46	0.70	100.4
Leucin	0.13	0.36	96.1
"	0.26	0.47	91.9
"	0.39	0.60	93.5
"	0.52	0.74	96.5
"	0.77	0.93	89.9
Valin	0.26	0.50	101.9
"	0.52	0.76	101.2
"	0.77	0.94	91.1
"	1.03	1.13	86.9
"	1.54	1.57	86.5
Isoleucin	0.04		
Leucin	0.06		
Valin	0.13		
Σ VKAS	0.23	0.44	90.0
Isoleucin	0.08		
Leucin	0.13		
Valin	0.26		
Σ VKAS	0.46	0.70	99.6
Isoleucin	0.15		
Leucin	0.26		
Valin	0.52		
Σ VKAS	0.93	1.09	92.4

Wiederfindung $98.3 \pm 4.9 \%$ ($\bar{x} \pm SD$, $n = 12$); bei weiterer Erhöhung der Konzentration um bis zu 0.93 mmol/l betrug sie $91.1 \pm 1.2 \%$ ($\bar{x} \pm SD$, $n = 3$).

Bei Erhöhung der Valinkonzentration um 1.03 bzw. 1.54 mmol/l sank die Wiederfindung weiter ab auf ca. 87% (siehe Tabelle 3).

Valin wurde in der Hauptreaktion langsamer umgesetzt als Leucin und Isoleucin. Bei hohen Valinkonzentrationen ($\Delta[\text{VKAS}] \geq 0.77$) war die Meßreaktion nach 60 Minuten noch nicht beendet. In diesen Fällen mußten die Wiederfindungen als systematisch vermindert angesehen werden.

Im Verlauf dieser Studie wurden bei Normalpersonen und Patienten in verschiedensten Stoffwechsellagen Serumkonzentrationen der VKAS von minimal 0.23 mmol/l und maximal 1.04 mmol/l gemessen. In allen Fällen war die Meßreaktion nach 60 Minuten abgelaufen.

Die Daten zeigen, daß bei Serumkonzentrationen der VKAS im Bereich von ca. 0.3 bis ca. 0.8 mmol/l mit ca. 100% iger Wiederfindung gerechnet werden kann. Bei Serumkonzentrationen der VKAS im Bereich von ca. 0.8 bis ca. 1.2 mmol/l muß eine allmähliche Verringerung der Wiederfindung von ca. 100% auf ca. 90% in Betracht gezogen werden.

Bei der Bestimmung der Konzentration der VKAS in Patientenserum wurde dies jedoch nicht rechnerisch ausgeglichen. Bei Serumkonzentrationen der VKAS über 1.2 mmol/l sollte vor der Bestimmung eine Verdünnung des Serums vorgenommen werden.

Nebenreaktionen

In der verwendeten LAT-Lösung fanden sich Verunreinigungen mit Alanin Aminotransferase (ALAT) und Aspartat Amino-transferase (ASAT, EC 2.6.1.1.). Ihre Aktivitäten wurden unter optimierten Standardbedingungen gemessen und betru- gen 0,40 U/ml (ALAT) bzw. 0,58 U/ml (ASAT).

ALAT und ASAT verursachen in der Probe folgende Nebenreak- tionen:

Alanin + α -KG $\xrightarrow{\text{ALAT}}$ Pyruvat + Glutamat

Aspartat + α -KG $\xrightarrow{\text{ASAT}}$ Oxalacetat + Glutamat

Das so entstehende Glutamat wird durch die Indikatorreak- tion umgesetzt. Das Ausmaß dieser Fehlerquelle wurde durch Wiederfindungsversuche quantifiziert:

Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 angegeben. Die Konzentra- tion von Alanin bzw. Asparaginsäure in menschlichem Serum, 1 : 1 verdünnt mit Aqua bidest., wurde durch Zugabe von Alanin bzw. Asparaginsäure um die angegebenen Beträge er- höht ($\Delta[\text{AS}]$).

Nach 60 Minuten wurden maximal 1,8 % des zugesetzten Ala- nins und maximal 45,6 % der zugesetzten Asparaginsäure wiedergefunden.

Die niedrige Wiederfindung von Alanin zeigt, daß die genan- nte ALAT-Aktivität bei der Bestimmung der Serumkonzentra- tion der VKAS nur einen geringfügigen Einfluß hat.

Die Asparaginsäurekonzentration im Serum bzw. Plasma liegt unter Normalbedingungen zwischen 0,001 und 0,011 mmol/l

Tabelle 4 : Wiederfindung von Alanin und Asparaginsäure

Zugesetzte Aminosäure	in Serum		
	$\Delta[\text{AS}]$ [mmol/l]	Meßwert [mmol/l]	mittlere Wiederfindung [%]
Ø	0	0.25 ± 0.03 (n = 7)	Ø
Alanin	0.34	0.25	-0.3
"	0.68	0.26	1.8
"	1.35	0.27	1.4
"	2.03	0.28	1.7
Asparaginsäure	0.11	0.30	45.6
"	0.23	0.34	38.4
"	0.34	0.40	42.4
"	0.46	0.46	45.0
"	0.69	0.50	35.9

(41, 57, 71). Bei so niedrigen Konzentrationen sind Wiederfindungen von ca. 40 % für die Bestimmung der VKAS im Serum bedeutungslos.

Ungefrorenes Nüchternserum, das erst nach 4 - 24 Stunden weiterverarbeitet wurde, wies erhöhte Asparaginsäurekonzentrationen auf: Katz und Keck fanden z.B. nach 10 - stündigem Stehen bei 22°C Asparaginsäurekonzentrationen im Serum von 0.016 ± 0.004 mmol/l ($\bar{x} \pm \text{SD}$) (41).

Erheblich höhere Asparaginsäurekonzentrationen finden sich in Erythrozyten und Leukozyten (71) und folglich im hämolytischen Serum bzw. Plasma. Das beschriebene Meßverfahren ist daher zur Bestimmung der VKAS im hämolytischen Serum bzw. hämolytischen Plasma nicht geeignet.

III. Anwendung der Methode

A Ermittlung von Normalwerten

Bei 36 gesunden Probanden (med.-technisches Personal) wurden nach 12 - 13 stündigem Fasten zwischen 8⁰⁰ und 9⁰⁰ Uhr jeweils Blutproben von 5 - 10 ml aus der Armvene entnommen. Die Seren wurden bis zur enzymatischen Bestimmung der VKAS bei -20°C gelagert.

Tabelle 5 gibt einen Überblick über das Geschlecht, das Lebensalter, die Körpergröße und das Körpergewicht der Probanden, sowie über die Differenz zwischen ihrem Körpergewicht und ihrem Idealgewicht (berechnet nach der mod. Broca-Formel: Idealgewicht = $k \cdot (\text{Körpergewicht}[\text{cm}] - 100)$ mit $k = 0.90$ bei Männern und $k = 0.85$ bei Frauen).

Tabelle 5 : Anthropometrische Daten der Normalpersonen

	Alter [Jahre]	Größe [cm]	Gewicht [kg]	Körpergew. - - Idealgew. [kg]
Männer				
$\bar{x} \pm \text{SD}$ (n = 11)	31 $\pm$ 7	178 $\pm$ 4	68 $\pm$ 5	-2.5 $\pm$ 4.7
Bereich	20 - 39	170 - 186	59 - 76	-9.4 - +7.0
Frauen				
$\bar{x} \pm \text{SD}$ (n = 25)	29 $\pm$ 7	167 $\pm$ 5	57 $\pm$ 7	+0.2 $\pm$ 6.2
Bereich	20 - 46	155 - 179	48 - 75	-7.5 - +18.9

Ergebnisse

Der statistische Vergleich mit dem einseitigen Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (65) zeigte, daß bei Männern signifikant höhere Serumkonzentrationen der VKAS vorlagen, als bei Frauen ($p < 0.005$). Es wurden folgende Werte ermittelt:

Männer:		Frauen:	
n	= 11	n	= 25
$\bar{x}$	= 0.58 mmol/l	$\bar{x}$	= 0.52 mmol/l
SD	= 0.05 mmol/l	SD	= 0.05 mmol/l
Bereich : 0.50 mmol/l -		Bereich : 0.42 mmol/l -	
- 0.66 mmol/l		- 0.63 mmol/l	

Die Annahme einer Normalverteilung konnte mit dem David-Test (65) auch auf dem 10 % - Niveau weder bei den Männern noch bei den Frauen abgelehnt werden.

Abbildung 5 zeigt die Histogramme der Meßwerte.

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Konzentration der VKAS und dem Lebensalter, dem Körpergewicht oder der Differenz von Körpergewicht und Idealgewicht bei Männern oder Frauen gefunden werden.

Dennoch soll erwähnt werden, daß die Probandin mit der höchsten Konzentration der VKAS ein Übergewicht von 33.7 % hatte.

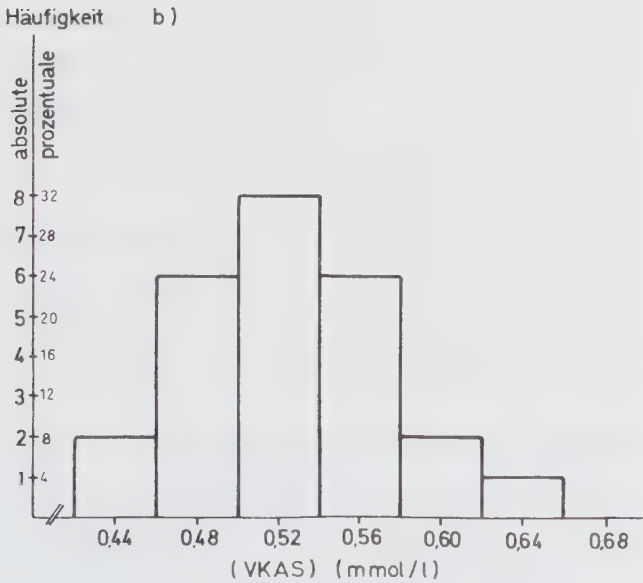
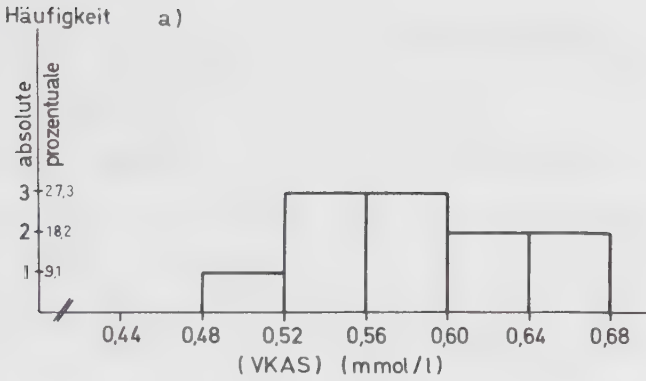


Abbildung 5 : Histogramme der verzweigtkettigen Serumamino-
säuren von 11 Männern (a) und 25 Frauen (b).

Literaturvergleich

Die Konzentration der VKAS im Serum ist gleich der im Plasma (41). Normalwerte (gemessen mittels Ionenaustausch-Chromatographie) wurden von zahlreichen Autoren veröffentlicht (6, 15, 26, 31, 50, 57, 71, 74); die Daten von Armstrong und Stave basieren auf den größten Fallzahlen.

Die Summen ihrer Mittelwerte ($\bar{x}_{Val} + \bar{x}_{Leu} + \bar{x}_{Ile}$) liegen um 0.09 mmol/l (Männer) bzw. 0.12 mmol/l (Frauen) unter den von uns gefundenen Mittelwerten ($p < 0.0001$, zweiseitiger t - Test für unabhängige Stichproben (65)).

Die Frage, ob diese Differenzen überwiegend zurückzuführen sind auf die Verschiedenheit der Kollektive (insbesondere in Hinblick auf den Proteingehalt der Nahrung (26)) oder die Verschiedenheit der Meßverfahren muß vorläufig noch unbeantwortet bleiben.

Unsere Angaben über die Geschlechtsabhängigkeit der Serumkonzentration der VKAS, ihre jeweilige Normalverteilung und ihre Standardabweichungen stimmen mit den Daten der genannten Autoren überein.

Einfluß von körperlicher Aktivität

Eine im Selbstversuch durchgeführte Belastung am Fahrrad-Ergometer mit 770 kg•m/min, 15 Minuten lang, und anschließend 1230 kg•m/min, 6 Minuten lang, ergab keine Veränderung der Serumkonzentration der VKAS in den zu verschiedenen Zeiten des Versuchs abgenommenen Blutproben.

Dieser Einzelbefund bestätigt die Ergebnisse mehrerer Autoren (15, 19, 77), die bei gesunden männlichen Erwachsenen nach 10 - 60 minütiger Belastung mit 400 - 1200 kg•m/min entweder keine signifikanten Veränderungen oder nur geringfügige Erhöhungen (nach 40 minütiger Belastung mit 800 bzw. 1200 kg•m/min) (19) der verzweigtkettigen Plasmaamino-säuren feststellten.

B Verhalten der verzweigtkettigen Serumamino-säuren
beim Fasten

18 adipöse Patientinnen im Alter von 19 - 57 Jahren unterzogen sich einer stationären Fastenkur. Diese war gegliedert in eine 14 tägige Phase absoluten Fastens (Nulldiät) und eine unmittelbar vorausgehende oder unmittelbar anschließende 14 tägige Phase relativen Fastens (Reduktionsdiät). 10 Patientinnen begannen die Fastenkur mit Nulldiät (Gruppe I), 8 Patientinnen mit Reduktionsdiät (Gruppe II).

Die anthropometrischen Daten sind für Gruppe I in Tabelle 6 und für Gruppe II in Tabelle 7 zusammengefaßt.

In der Phase absoluten Fastens erhielten die Patientinnen kalorienfreie Flüssigkeit ad libitum, Vitamine¹ und - bei Bedarf - ein Uricosuricum². In der Phase relativen Fastens erhielten sie täglich 120 Gramm ($\hat{=}$ 600 kcal) eines standardisierten Nahrungskonzentrats³ (Zusammensetzung siehe Tabelle 8).

4 Tage vor Beginn der Fastenkur, sowie am Morgen des ersten Fastentages wurden nach 12 - 13 stündiger Nahrungskarenz zwischen 8⁰⁰ und 9⁰⁰ Uhr ca. 10 ml Blut entnommen. Ebenso wurde während der Fastenkur alternierend jeden 3. bzw. 4. Tag verfahren.

¹ Multibionta^(R) ² Uricovac^(R) ³ Biosorbin^(R)

Die statistischen Paarvergleiche wurden mit dem einseitigen Wilcoxon-Test für Paardifferenzen durchgeführt (65).

Tabelle 6 : Anthropometrische Daten der Patientinnen in Gruppe I

	Mittelwert	Bereich	n = 10
Lebensalter [Jahre]	37	19 - 55	
Körpergröße [cm]	161	153 - 171	
relatives Übergewicht vor der Fastenkur [%]	71	38 - 127	
Körpergewicht vor der Fastenkur [kg]	89	69 - 135	
Körpergewicht nach der Nulldiät [kg]	80	62 - 122	
Körpergewicht nach der Reduktionsdiät [kg]	81	63 - 122	

Tabelle 7 : Anthropometrische Daten der Patientinnen in Gruppe II

	Mittelwert	Bereich	n = 8
Lebensalter [Jahre]	34	20 - 57	
Körpergröße [cm]	164	156 - 170	
relatives Übergewicht vor der Fastenkur [%]	80	50 - 114	
Körpergewicht vor der Fastenkur [kg]	98	85 - 120	
Körpergewicht nach der Reduktionsdiät [kg]	94	82 - 112	
Körpergewicht nach der Nulldiät [kg]	88	74 - 104	n = 5

Tabelle 8 : Zusammensetzung des standardisierten
Nahrungskonzentrates¹

<u>In 120 g Trockensubstanz sind enthalten</u>	
Joule	ca. 2520 kJ
Kalorien	600 kcal
15 Kal. % Eiweiß	
Eiklar-und Milch- eiweiß	22.39 g
L-Cystin	410 mg
35 Kal. % Fett	
Triglyceride	18.2 g
Linol-und Linolen- säure	3.0 g
Ölsäure	1.6 g
50 Kal. % Kohlenhydrate	
Glucose	1.7 g
Lactose	11.6 g
Maltose	4.0 g
Polysaccharide	51.1 g
Zugesetzte Vitamine	
A	900 IE
B 1	0.3 mg
B 2	0.5 mg
Nikotinamid	4.8 mg
B 6	3.0 mg
B 12	0.6 µg
Folsäure	0.6 mg
Biotin	0.7 mg
Pantothensäure	2.4 mg
Ascorbinsäure (C)	30.0 mg
D 3	120 IE
D,L-Tokopherol (E)	12.0 mg
K 1	0.3 mg
Mineralstoffe	
Na ⁺	24 mval
K ⁺	24 mval
Ca ⁺⁺	11 mval
Mg ⁺⁺	7 mval
Cl ⁻	25 mval
P	8 mmol
Wasser	3.6 g

¹ Biosorbin[®], Hersteller: Fa. J. Pfrimmer + Co.
Erlangen

Ergebnisse

Gruppe I

Tabelle 9 faßt die in Gruppe I gemessenen Serumkonzentrationen der VKAS zusammen.

4 Tage vor Beginn der Fastenkur, sowie am Morgen des 1. Fastentages (d.h. zum Zeitpunkt Null) lagen die VKAS, mit einer Ausnahme (Pat. V.F.), im Normalbereich gesunder Frauen.

In der Phase der Nulldiät wurde bei allen Patientinnen ein biphasischer Verlauf der VKAS beobachtet (Abb. 6 a). Bei 8 Patientinnen war das Maximum nach 3 tägiger Nulldiät, bei 2 Patientinnen nach 7 tägiger Nulldiät erreicht. Die VKAS waren, verglichen mit den Ausgangswerten (zum Zeitpunkt Null), sowohl nach 3, wie nach 7 und 10 tägiger Nulldiät signifikant erhöht (jeweils mit $p < 0.01$). Sie lagen nach 3 tägiger Nulldiät um durchschnittlich 64 %, nach 7 tägiger Nulldiät um durchschnittlich 33 % und nach 10 tägiger Nulldiät um durchschnittlich 16 % über den Ausgangswerten. Nach 14 tägiger Nulldiät bestand kein signifikanter Unterschied mehr zu den Ausgangswerten.

In der darauffolgenden Phase der Reduktionsdiät wurde eine Verminderung der VKAS beobachtet (Abb. 6 a). Nach 3, 7, 10 und 14 tägiger Reduktionsdiät lagen die VKAS signifikant unter den Ausgangswerten (jeweils mit $p < 0.05$, nach 14 tägiger Reduktionsdiät mit $p < 0.01$).

Tabelle 9 : Verlauf der verzweigtkettigen Serumamino-säuren bei
10 Patientinnen (Gruppe I) vor und während dem Fasten

Patientinnen	-4	0	3	7	10	14	17	21	24	28
	[VKAS] _{Serum} [mmol/l] nach X Fastentagen									
G.R.	0.57	-	0.86	0.74	0.65	0.60	0.33	0.29	0.39	0.37
M.M.	0.50	0.45	0.76	0.68	0.62	0.56	0.34	0.31	0.37	0.35
A.F.	-	0.50	0.78	0.85	0.61	0.66	0.52	0.58	0.39	0.34
I.Z.	-	0.47	0.76	0.74	0.57	0.48	0.50	0.53	0.49	0.39
M.D.	-	0.52	0.59	0.75	0.57	0.55	0.42	0.48	-	0.50
T.O.	0.55	0.52	1.02	0.57	0.58	0.42	0.42	0.46	0.40	0.44
V.F.	0.39	0.50	0.84	0.62	0.57	0.46	0.38	0.33	0.31	0.36
M.S.	0.48	0.44	0.88	0.72	0.60	0.46	0.45	0.36	0.61	0.34
R.S.	-	0.58	0.85	0.57	0.57	0.57	0.57	0.57	-	0.52
E.L.	-	0.63	-	0.68	0.60	0.62	0.53	0.38	0.43	0.41
$\bar{x}$	0.50	0.51	0.82*	0.69*	0.59*	0.54	0.45 ⁺	0.43 ⁺	0.42 ⁺	0.40*
$\pm$ SD	0.07	0.06	0.12	0.09	0.03	0.08	0.08	0.11	0.09	0.06
n	5	9	9	10	10	10	10	10	8	10

+ p < 0.05 , * p < 0.01

Gruppe II

Tabelle 10 faßt die in Gruppe II gemessenen Serumkonzentrationen der VKAS zusammen.

4 Tage vor Beginn der Fastenkur, sowie am Morgen des 1. Fastentages lagen die VKAS, mit einer Ausnahme (Pat. V.K.), im Normalbereich gesunder Frauen.

In der Phase der Reduktionsdiät zeigten die Mittelwerte der VKAS einen biphasischen Verlauf, wobei das Maximum erst nach 10 tägiger Reduktionsdiät erreicht wurde. Es lag 22 % über den Ausgangswerten ($p < 0.05$) (Abb. 6 b). Bei Betrachtung der Einzelverläufe war der biphasische Verlauf bei 6 Patientinnen gut zu erkennen.

In der Phase der Nulldiät wurde ebenfalls ein biphasischer Verlauf der VKAS beobachtet (Abb. 6 b). Bei 5 Patientinnen war das Maximum nach 3 tägiger Nulldiät, bei 2 Patientinnen nach 7 tägiger Nulldiät erreicht. Die VKAS waren, verglichen mit den Ausgangswerten, sowohl nach 3, wie nach 7 und 10 tägiger Nulldiät signifikant erhöht (jeweils mit $p < 0.01$). Sie lagen nach 3 tägiger Nulldiät um durchschnittlich 31 %, nach 7 tägiger Nulldiät um durchschnittlich 22 % und nach 10 tägiger Nulldiät immer noch um durchschnittlich 13 % über den Ausgangswerten. Nach 14 Tagen Nulldiät waren die Konzentrationen der VKAS nicht mehr signifikant verschieden von den Ausgangswerten.

Tabelle 10 : Verlauf der verzweigt-kettigen Serumamino-säuren bei
8 Patientinnen (Gruppe II) vor und während dem Fasten

Patientinnen	[VKAS] _{Serum} [mmol/l] nach X Fastentagen									
	-4	0	3	7	10	14	17	21	24	28
V.K.	0.42	0.46	0.63	0.67	0.60	-	0.61	0.55	0.51	0.50
I.H.	0.52	0.57	-	0.70	0.74	0.70	0.87	0.59	0.58	0.45
M.Z.	0.45	0.51	0.45	0.50	0.65	0.47	0.71	0.71	0.58	-
H.B.	-	0.60	0.58	0.64	0.57	0.55	0.70	0.94	0.71	0.69
C.D.	0.56	0.60	0.76	0.59	0.66	0.54	0.79	0.72	0.74	0.61
B.S.	0.50	0.44	0.46	0.64	0.61	0.45	0.57	0.45	0.50	0.47
A.G.	0.49	-	0.73	0.52	0.76	0.36	0.66	0.60	0.58	-
H.O.	0.50	0.53	0.48	0.54	0.65	0.66	-	-	-	-
$\bar{x}$	0.49	0.53	0.58	0.60	0.66 ⁺	0.53	0.70*	0.65*	0.60*	0.55
$\pm$ SD	0.05	0.06	0.13	0.08	0.07	0.12	0.10	0.16	0.09	0.10
n	7	7	7	8	8	7	7	7	7	5

+ p < 0.05 , * p < 0.01

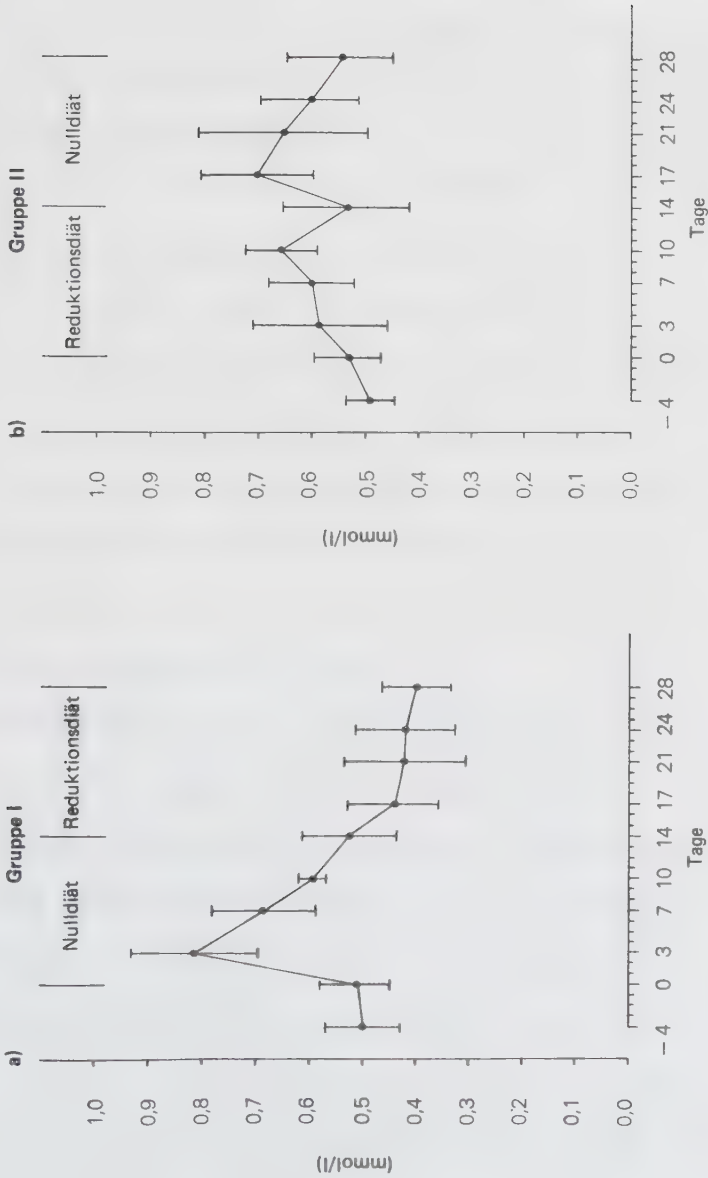


Abbildung 6.: Verlauf der verzweigtkettigen Serumamino-säuren vor und während dem Fasten ($\bar{x} \pm SD$); a) Gruppe I (10 Patientinnen); b) Gruppe II (8 Patientinnen).

Diskussion der Ergebnisse

Ein Anstieg und nachfolgender Abfall der VKAS im Plasma übergewichtiger Patienten während mehrwöchigem absoluten Fasten wurde erstmals im Jahre 1968 von Adibi (1) und davon unabhängig 1969 von Felig et al. (16) beschrieben. Ihre Resultate decken sich nahezu vollständig mit den Ergebnissen der Phase absoluten Fastens in Gruppe I.

Möglicherweise kommt der Verfügbarkeit von Pyruvat in Relation zur Proteolyse eine ursächliche Bedeutung zu: Beim Fasten bewirkt der initiale Insulinabfall (54, 62), zusammen mit dem Glucagonanstieg (48, 76), in Leber und Muskulatur eine Hemmung der Proteinbiosynthese und Steigerung der Proteolyse (3, 47, 49, 52, 64). Die Aminogruppen der folglich vermehrt anfallenden VKAS werden in der Muskulatur durch die in Abbildung 1 wiedergegebenen Reaktionen auf Pyruvat übertragen (34, 52). Die resultierende Steigerung der Alaninproduktion (62) wird bei sinkender Glucosekonzentration im Blut (54) möglicherweise limitiert durch die abnehmende Verfügbarkeit von Pyruvat im Muskelgewebe (52, 61). Eine Verknappung dieses Stickstoff-Acceptors müßte sich notwendigerweise als Engpaß im Abbau der VKAS auswirken und bei vermehrtem Zustrom infolge gesteigerter Proteolyse einen Rückstau der VKAS verursachen (siehe Abb. 1 und 2).

Nach einigen Fastentagen steigt die Effektivität des Fettsäureabbaus, u.a. aufgrund zunehmender Verwertbarkeit der

Ketonkörper (53). Der Glucosebedarf des Organismus sinkt (54), so daß Proteolyse (82) und Gluconeogenese (54) sukzessiv gedrosselt werden können. Im Extrazellularraum fällt der Spiegel der VKAS folglich kontinuierlich ab (21).

Ein prinzipiell gleichartiger Verlauf der VKAS findet sich, falls der Phase absoluten Fastens, wie in Gruppe II, eine Phase der Reduktionsdiät vorausgeht. In diesem Falle liegt die mittlere Serumkonzentration der VKAS, nach 3 tägigem absoluten Fasten, statt um 64 % nur um 31 % über den Ausgangswerten. Diese weniger stark ausgeprägte Zunahme der VKAS ist möglicherweise Folge einer bereits in der Phase der Reduktionsdiät erfolgten, teilweisen Umstellung des Organismus auf Protein sparenden und vermehrt Fettreserven verbrauchenden Katabolismus.

Unter Reduktionsdiät wird in Gruppe II das nur 22 % über den Ausgangswerten liegende Maximum erst nach 10 Tagen erreicht. Zimmermann-Telschow und Müller-Wecker fanden unter kohlenhydratarmer Diät von 1100 bzw. 1510 kcal/Tag stärkere, frühzeitigere und längerfristige Zunahmen der Plasmakonzentrationen der VKAS (84). Dabei ist jedoch zu bedenken, daß die von diesen Autoren verwendeten Diäten deutlich höhere Proteinnengen enthielten als die von uns verwendete Reduktionsdiät.

Durch erhöhte Proteinzufuhr bei kataboler Stoffwechsellaage des Organismus wird eine stärkere, frühzeitigere und län-

gerfristige Konzentrationserhöhung der VKAS im Blut provoziert (84).

Demgegenüber wird durch erhöhte Zufuhr von Kohlenhydrat-Kalorien eine Verminderung der VKAS im Blut bewirkt (2, 4, 26, 75, 84).

Die Relation der Kohlenhydrat-Kalorien/ g Protein in der Kost liefert somit einen guten Parameter zur Kennzeichnung des Einflusses einer Diät auf die VKAS im Blut (84). Sie beträgt bei den von Zimmermann-Telschow und Müller-Wecker verwendeten Diäten 5.0 bzw. 2.5 bzw. 4.5 kcal/g, bei unserer Reduktionsdiät jedoch 12.2 kcal/g.

Die bisher beschriebenen Phasen relativen oder absoluten Fastens in Gruppe I und II bedeuteten jeweils erhebliche Verminderungen der Nahrungszufuhr. Unter den Bedingungen der Gruppe I kommt es jedoch mit Beginn der Reduktionsdiät zu einer Steigerung der Nahrungszufuhr. Dieser Gegensatz spiegelt sich wider im Verlauf der VKAS:

Statt einer Zunahme wird eine insbesondere in den ersten 3 Tagen erfolgende, signifikante Abnahme der VKAS beobachtet.

Ähnliche Veränderungen finden sich unter isokalorischer Repletion nach 6 - 10 tägigem absoluten Fasten (2, 67). Schaeffer et al. ersetzten dabei die orale Proteinzufuhr durch die Infusion von Aminosäurelösungen; auf diese Weise konnten sie zeigen, daß die Steilheit der Abnahme der ver-

zweigkettigen Plasmaamino-säuren vom E/T - Quotienten¹ der Infusionslösung abhängt (67).

Hier berühren wir ein zentrales Problem der Ernährungsmedizin: Die Adaptation der parenteralen Ernährung an den aktuellen Bedarf des Organismus unter verschiedenen pathologischen Bedingungen.

Knauff et al. wiesen bereits im Jahre 1966 darauf hin, daß es zur Beurteilung einer Aminosäureinfusionslösung notwendig sei, die Plasmaamino-säuren im zeitlichen Verlauf genau zu verfolgen. Ein gleichbleibendes, den physiologischen Verhältnissen entsprechendes Plasmaamino-säuremuster beweise am sichersten, daß eine Infusionslösung gut ausbalanciert und damit optimal nutzbar sei (45).

Unter konventioneller parenteraler Ernährung kommt es jedoch z.B. postoperativ zu erheblichen Abweichungen vom normalen Plasmaaminogramm. Vorrangig betroffen sind die VKAS, sowie Methionin/Zystin, Phenylalanin/Tyrosin und Glycin/Serin (13). Geringfügige und nicht signifikante Abweichungen vom Normmuster (Phenylalanin bzw. Prolin bzw. Glutaminsäure ausgenommen) werden beobachtet bei Verwendung von Aminosäurelösungen², die den Besonderheiten der postoperativen Stoffwechselsituation angepaßt wurden (14, 39, 56).

¹ Verhältnis der essentiellen Aminosäuren in g (E) zum Gesamtstickstoff in g (T).

² Traumafusin[®] bzw. Traumasteril[®].

Diese Befunde dürfen als Hinweise dafür gewertet werden, daß die Bestimmung der verzweigtkettigen Serumamino­säuren mittels der hier beschriebenen Methode einen Beitrag zur Erfolgskontrolle der parenteralen Ernährung leisten kann.

C Verhalten der verzweigt-kettigen Serumamino-säuren
bei verschiedenen Erkrankungen

Für die Untersuchungen wurden 38 Patienten der medizinischen Kliniken des Krankenhauses München-Schwabing ausgewählt, die sich in kataboler Stoffwechsellaage von unterschiedlicher Dauer und Stärke befanden. Die Blutentnahmen aus der Armvene erfolgten - falls nicht anders vermerkt - zwischen 7⁰⁰ und 9³⁰ Uhr nach einer Nahrungskarenz von ca. 12 Stunden. Das Serum wurde zunächst bei +10°C 1 - 12 Stunden aufbewahrt und dann bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die klinischen Daten der Patienten und die entsprechenden Laborbefunde wurden den Krankenakten entnommen.

Ergebnisse

Die Serumkonzentrationen der VKAS von akut erkrankten und maximal 2 Wochen lang hypocalorisch ernährten Patienten lagen - mit einer Ausnahme (Patient G.J., am 1. Krankheitstag) - über den oberen Normgrenzen (siehe Tabelle 11 und 12). Steigerung der Nahrungszufuhr (siehe Tabelle 12) aber auch länger andauernde hypocalorische Ernährung (Patientin B.R.) führten zu ihrer Normalisierung. Ebenfalls normale Konzentrationen wurden bei isocalorisch ernährten Malignom-Patienten gemessen (Patient P.S. ausgenommen) (siehe Tabelle 13 b); bei langfristig hypo-

calorisch ernährten Malignom-Patienten unterschritten sie jedoch die unteren 1 s - Grenzen der Normbereiche (siehe Tabelle 13 a).

Infusion von Zuckerlösungen bei akut erkrankten Patienten ohne diabetische Stoffwechselstörung (siehe Tabelle 14 a) sowie Infusion von Zuckerlösungen und Alt-Insulin bei akut erkrankten Patienten mit diabetischer Stoffwechselstörung (siehe Tabelle 15) führten zur Verminderung der Konzentration der VKAS unter die unteren Normgrenzen. Andererseits lagen sie bei akut erkrankten Patienten, deren diabetische Stoffwechselstörung bis dahin unentdeckt geblieben war, während Infusion von Zuckerlösungen (ohne Insulin) im oder über dem Normbereich (siehe Tabelle 14 b). Bei dekompensierten Diabetikern mit Ketoacidose lagen die verzweigtkettigen Serumamino-säuren bis 3 Stunden nach Therapiebeginn erheblich über den oberen Normgrenzen. Sie sanken 4 - 7 Stunden nach Therapiebeginn unter die untere Normgrenze und waren erst nach ca. 20 - 37 Stunden im Normbereich (siehe Tabelle 16).

Tabelle 11 : Serumkonzentrationen der VKAS bei akut erkrankten, hypocalorisch ernährten Patienten

Patienten ¹	Alter [Jahre]	Diagnose	Zeit ² , [Tage]	[VKAS] Serum [mmol/l]
F.B., ♂	73	cerebraler Gefäßinsult mit Hemiparese	7	0.88
K.C., ♂	34	subdurales Hämatom	9	0.72
G.F., ♂	40	Pneumonie	ca. 14	0.68
E.R., ♀	74	Erbrechen und Diarrhoe ungeklärter Ursache	2	0.77
H.K., ♀	78	Herzinfarkt	2	0.65
E.K., ♀	85	cerebrale Ischämie mit totaler Schlucklähmung	3	1.04
B.R., ♀	81	cerebraler Gefäßinsult	29	0.59

¹ Seit Beginn der Erkrankung konnten die Patienten entweder überhaupt nicht (Pat. H.K. und E.K.) oder nur in sehr eingeschränktem Maße oral ernährt werden. Eine parenterale Ernährung bis zur Zeit der Blutentnahme wurde nur bei Patient F.B. durchgeführt (1000 ml FGX 24 % / die). Die anderen Patienten wurden teils überhaupt nicht, teils seit mehreren Tagen nicht mehr (Pat. K.C. und B.R.) parenteral ernährt.

² Die Angaben beziehen sich auf die Zeit zwischen dem Beginn der Erkrankung und der Blutentnahme.

Tabelle 12 : Verläufe der Serumkonzentrationen der VKAS bei akut erkrankten Patienten

Patienten ¹	Alter [Jahre]	Diagnose und Verlauf	Ernährung ¹	Zeit ² [Tage]	[VKAS] Serum [mmol/l]
G.J., ♂ " " , "	73 "	Blutung aus penetriertem Ulcus duodeni gute Besserung des AZ	Ø normal	1 17	0.66 0.48
G.S., ♂ " " , "	54 "	akute Enteritis Restitutio ad integrum	Tee-Zwieback Diät normal	2 7	0.67 0.54
R.A., ♀ " " , " " " , "	71 " "	akute Lungenembolie AZ leicht gebessert gute Besserung des AZ	Ø 750 kcal/die DK 1000 kcal/die DK	1 2 5	0.89 0.73 0.60
H.B., ♀ " " , " " " , "	80 " "	cerebraler Gefäßinsult mit Hemiparese AZ unverändert gute Besserung des AZ	hypocalorisch " isocalorisch	4 7 15	0.82 0.87 0.62

¹ Die Patienten konnten zunächst entweder überhaupt nicht oder nur in sehr eingeschränktem Maße oral ernährt werden. Anschließend relativ rasche Besserung des Allgemeinzustandes (AZ) und Steigerung der Nahrungszufuhr. Eine parenterale Ernährung wurde nur bei Patient G.J. vom 2. - 8. Krankheitstag durchgeführt.

² Die Angaben beziehen sich auf die Zeit zwischen Erkrankungsbeginn und Blutentnahme.

Tabelle 13 : Serumkonzentrationen der VKAS bei Malignom-Patienten

Untergruppe	Patienten	Alter [Jahre]	Diagnose	[VKAS] Serum [mmol/l]
a ¹	M.T., ♂	66	metastasierendes Bronchial - Ca.	0.46
	A.K., ♂	68	metastasierendes Schilddrüsen - Ca.	0.48
	W.S., ♂	74	metastasierendes Magen - Ca.	0.44
	A.B., ♀	82	Magen - Ca.	0.45
	K.E., ♀	86	Corpus - Ca.	0.46
	M.F., ♀	88	Gallengangs - Ca.	0.45
	C.S., ♀	48	metastasierendes Bronchial - Ca.	0.43
	M.W., ♀	70	metastasierendes Colon - Ca.	0.43
	K.M., ♀	73	metastasierendes Mamma - Ca.	0.40
b ²	P.S., ♂	51	Bronchial - Ca.	0.48
	L.K., ♂	63	metastasierendes Rectum - Ca.	0.53
	B.F., ♀	70	Knochenmetastasen, Primär-Tu. unbekannt	0.47
	A.K., ♀	84	malignes Lymphom	0.45

¹ Untergruppe a : Die Patienten hatten im Laufe ihrer Erkrankung oral immer weniger Nahrung zu sich genommen und konnten an den Tagen vor der Blutentnahme entweder überhaupt nicht mehr (Pat. K.E.) oder nur noch in sehr eingeschränktem Maße ernährt werden.

² Untergruppe b : Die Patienten nahmen entweder von sich aus Nahrung in ausreichender Menge zu sich oder sie erhielten zusätzlich ein Nahrungskonzentrat von 500 bzw. 1000 kcal/die (Pat. L.K. bzw. P.S.). Eine parenterale Ernährung wurde nur bei Patientin B.F. durchgeführt (1000 ml Fructose 5 % pro Tag).

Tabelle 14 : Serumkonzentrationen der VKAS während oder unmittelbar nach Infusion von Zuckerlösungen bei akut erkrankten Patienten

Patienten ¹	Alter [Jahre]	Diagnose	Infusion (500 ml)	[VKAS] _{Serum} [mmol/l]	EZ [mg %]
a ²					
F.K., ♂	81	tachycarde Herzrhythmusstörung	Fructose 5 %	0.47	
" " , "	"	"	FGX ⁴ 24 %	0.38	
M.M., ♀	32	akute Schlafmittelvergiftung	Fructose 5 %	0.38	
" " , "	"	"	Fructose 5 %	0.42	
" " , "	"	"	Glucose 5.7 %	0.40	
" " , "	"	"	Glucose 5.7 %	0.39	
b ³					
M.B., ♀	75	cerebraler Gefäßinsult, Diabetes	Fructose 10 %	0.66	299
K.K., ♀	78	bradycarde Herzrhythmusstörung, Diabetes	Fructose 5 %	0.57	

¹ Die Ernährung der Patienten war nicht einheitlich: Patient F.K. und Patientin K.K. konnten mit passierter Kost ernährt werden; Patientin M.B. erhielt ein Nahrungskon-
zentrat von ca. 1500 kcal/die; Patientin M.M. wurde ausschließlich, die anderen Pa-
tienten wurden zusätzlich mit Zuckereinfusionen ernährt.

² Untergruppe a : Patienten ohne diabetische Stoffwechselstörung.

³ Untergruppe b : Unentdeckte Diabetiker.

⁴ FGX enthält Fructose : Glucose : Xylit im Verhältnis 2 : 1 : 1 .

Tabelle 15 : Serumkonzentrationen der VKAS bei akut erkrankten Patienten während oder unmittelbar nach Infusion von Zuckerlösungen und Alt-Insulin

Patienten ¹	Alter [Jahre]	Diagnose	Infusionen ²	[VKAS] _{Serum} [mmol/l]
J.B., ♂	50	Polytrauma Diabetes	1500 ml Fructose 5 % und 6 E/h Alt-Insulin	0.32
O.B., ♂	58	Z.n. Hemicolectomie Diabetes	500 ml Fructose 5 % und 500 ml FGX ³ 40 % und 1.2 E/h Alt-Insulin	0.38
A.F., ♀	26	massivstes Hirnödem Diabetes	500 ml FGX ³ 24 % und 500 ml Glucose 5.7 % mit 28 E Alt-Insulin	0.38
L.H., ♀	71	Z.n. Kreislaufstillstand	500 ml Glucose 10 % mit 12 E Alt-Insulin	0.27
E.L., ♀	72	Herzinfarkt	500 ml Glucose 10 % mit 12 E Alt-Insulin	0.28

¹ Die Patienten J.B., O.B. und A.F. waren insulinpflichtige Diabetiker, die anderen Patienten befanden sich vorübergehend in einer diabetischen Stoffwechselleage.

² Alle Patienten mußten vollständig parenteral ernährt werden und zwar mit Zuckerlösungen, die Patienten J.B., O.B. und A.F. zusätzlich mit Aminosäurelösungen (Beginn der letzten Aminosäureinfusion mindestens 19 Stunden vor der Blutentnahme).

³ FGX enthält Fructose : Glucose : Xylit im Verhältnis 2 : 1 : 1 .

Tabelle 16 : Serumkonzentrationen der VKAS bei dekompensierten Diabetikern
vor und während der Behandlung

Patienten	Alter [Jahre]	Diagnose	Zeit: [Stunden]	pH	Aceton	Lactat [mmol/l]	BZ [mg %]	[VKAS] Serum [mmol/l]
D.S., ♂	35	ketoacidot. Coma DD Lactatacidose	0	7.22	++	10.7		0.79
" "	"	"	1.5					
" "	"	"	4				606	0.40
" "	"	"	6				478	0.23
" "	"	"	7			7.4		0.30
H.H., ♂	35	ketoacidotisches Präcoma	0	7.07	+++		240	
" "	"	"	1				252	0.90
" "	"	"	4			3.0	125	0.43
" "	"	"	6	7.31			277	0.43
O.B., ♂	58	dekompensierter Diabetes mellitus	0				687	
" "	"	"	4				318	0.39

Fortsetzung von Seite 48

Patienten	Alter [Jahre]	Diagnose	Zeit ¹ [Stunden]	pH	Aceton	Lactat [mmol/l]	BZ [mg %]	[VKAS] _{Serum} [mmol/l]
M.K., ♀	80	ketotisch decomp. Diabetes mellitus	0		+		337	
" , "	"	"	3				437	0.83
" , "	"	"	37				193	0.57
J.B., ♀	58	dekompensierter Diabetes mellitus	- 1 ²	7.31			655	0.61
M.S., ♀	78	diabetisches Präcoma	0				ca. 700	
" , "	"	"	ca. 20					0.48

¹ Die Angaben beziehen sich auf die Zeit zwischen dem Beginn der spezifischen Therapie und der Blutentnahme. Zeitpunkt 0 lag zwischen 5.30 und 16.00 Uhr.

² Unter Medikation mit Glibenclamid.

Diskussion der Ergebnisse

Als Folge eines größeren Traumas (64, 80) oder operativen Eingriffs (13, 14) kommt es im Rahmen des Postaggressionsstoffwechsels zu den prinzipiell gleichen Veränderungen der Konzentration der verzweigtkettigen Plasmaamino-säuren wie beim absoluten Fasten (1, 16). Ganz andere Verlaufsformen werden bei Anorexie infolge von Allgemeininfektionen beobachtet (78, 79); erhöhte Plasmakonzentrationen der VKAS treten dabei trotz erheblichem Katabolismus nicht auf.

Dies veranlaßte uns zur Bestimmung der verzweigtkettigen Serumamino-säuren bei verminderter Nahrungsaufnahme infolge von nichtinfektiösen, akuten Erkrankungen. Die Meßergebnisse zeigen Konzentrationsänderungen vom Fastentyp (siehe Tabelle 11).

Bei einem Teil der Patienten kam es nach einigen Tagen zu einer raschen Besserung des Gesundheitszustandes (siehe Tabelle 12). Die Zunahme der Nahrungsaufnahme und die Normalisierung des Grundumsatzes verdrängten den krankheitsbedingten Katabolismus und leiteten die anabole Stoffwechsellage des Genesungsstadiums ein. Unter diesem Einfluß sanken die zuvor deutlich erhöhten Serumkonzentrationen der VKAS auf im Normalbereich liegende Werte ab. Bei den Patienten G.J. und H.B. hätte ein Fortbestehen der katabolen Stoffwechsellage erfahrungsgemäß die gleiche Wirkung auf die VKAS gehabt. Deshalb kann aus der Abnahme der

verzweigtkettigen Serumamino-säuren in der 2. Krankheits-
woche nicht unbedingt auf eine Besserung des Gesundheits-
zustandes geschlossen werden.

Bei mehrwöchigem Fasten kommt es sekundär zu einer stetigen Abnahme der verzweigtkettigen Plasmaamino-säuren (1, 16); subnormale Konzentrationen werden nach ca. 4 Wochen erreicht (16, 17). Damit nähern sie sich dem Konzentrationsbereich, der typischerweise bei langdauernder, nicht-neoplastisch bedingter Anorexie (12), sowie bei chronischer Protein-und Kalorien-Mangelernährung gefunden wird (69). Noch niedrigere Plasmakonzentrationen der VKAS sind ein Charakteristikum chronischen Proteindefizits bei noch ausreichender Kalorienzufuhr (Kwashiorkor) (68, 69).

Wir bestimmten die verzweigtkettigen Serumamino-säuren bei langfristig hypocalorisch ernährten Malignom-Patienten und bestätigen mit unseren Resultaten die Ergebnisse von Hahn et al., die bei Tumorpatienten bereits vor Beginn der Strahlentherapie erniedrigte Plasmakonzentrationen feststellten (35). Demgegenüber ermittelten Clarke et al. normale Plasmakonzentrationen der VKAS bei anorektischen Krebspatienten mit mehr als 20 % igem Gewichtsverlust (12). Die Konzentrationsdifferenz zu den Patienten mit nichtneoplastisch bedingter Anorexie erklären sie mit gesteigerter Gluconeogenese bei erhöhtem Glucosebedarf des Tumors (siehe auch Seite 36). Bei Krebspatienten ohne

Gewichtsverlust (12) bzw. ohne Mangelerkrankung (Tabelle 13 b) liegen die VKAS übereinstimmend im Normbereich.

Insulin stimuliert die Aufnahme von Aminosäuren in die Muskelzellen und ihren Einbau in Muskelprotein (30). Darüberhinaus steigert es, in den Muskelzellen, die Verfügbarkeit von Pyruvat durch Förderung der Glykolyse (30). Pyruvat wird vermehrt umgesetzt zu Alanin (21); als Stickstoff-Donatoren dienen in erster Linie die VKAS (52). Auf diese Weise fördert Insulin nicht nur den Einbau der VKAS in Protein, sondern indirekt auch ihren Abbau durch Transaminierung.

Bei gesunden Versuchspersonen bewirken der Tolbutamid-Test und der orale oder intravenöse Glucose-Toleranz-Test eine erhebliche Verminderung der verzweigtkettigen Plasmaamino-säuren (4). Auch bei akut erkrankten, aber nichtdiabetischen Patienten wurden während oder unmittelbar nach Infusion von Zuckerlösungen deutlich erniedrigte Serumkonzentrationen der VKAS gefunden (trotz kataboler Stoffwechselslage) (75, Tabelle 14 a).

Bei eingeschränkter Stimulierbarkeit der Insulinsekretion ist diese Wirkung reduziert (siehe auch Tabelle 14 b) : Orale Glucose-Belastung induziert bei juvenilen Diabetikern, die 24 Stunden lang kein Insulin erhalten hatten, eine leichte Senkung der VKAS im Plasma (4). Möglicherweise kann dies zurückgeführt werden auf die Restsekretion von endogenem Insulin (gemessen am peripheren C-Peptid).

Exogenes Insulin senkt die verzweigtkettigen Plasmaamino-säuren sowohl bei gesunden Versuchspersonen (60, 83) als auch bei Diabetikern (10). Tabelle 15 zeigt wie ausgeprägt diese Wirkung sein kann.

Bei diabetischer Ketoacidose steigt die Plasmakonzentration der VKAS vor Behandlungsbeginn auf das 4 - 5 fache (44) bzw. 2 - 3 fache (5, 18) der Norm; bei dekompensierten Diabetikern mit Ketose aber ohne Acidose ist sie auf das ca. 1.5 fache erhöht (8, 36). Hall et al. untersuchten die Kinetik von Alanin und Glucose bei unbehandelten Diabetikern (36). Sie konnten zeigen, daß die bei Dekompensation auftretende Verminderung der Produktion von Alanin wahrscheinlich verursacht wird durch die ansteigende Konzentration der Ketonkörper und zwar über eine Hemmung der Glykolyse, mit resultierender Verringerung der Verfügbarkeit von Pyruvat (36) und über eine Einschränkung des Abbaus der VKAS (46).

Einsatz der Insulintherapie führt zur Senkung der verzweigtkettigen Serumamino-säuren: Nach 1 - 3 Stunden sind diese zwar noch auf das 1.5 fache erhöht (siehe Tabelle 16); nach 4 Stunden jedoch werden normale (5) und nach 4 - 7 Stunden sogar stark erniedrigte Konzentrationen gemessen (siehe Tabelle 16). Vollständige Rekompensation des Stoffwechsels führt dann zu ihrer Normalisierung (36). Die anfängliche Verzögerung im Abfall der verzweigtkettigen Serumamino-säuren ist möglicherweise auf die periphere

Insulinresistenz bei Ketoacidose (Patient D.S. und H.H.) bzw. bei Patientin M.K. auf die Insuffizienz der Therapie zurückzuführen.

Während der Behandlung des Coma diabeticum kommt es typischerweise zu einer Trübung des Sensoriums, die bis zum Koma führen kann (9, 40). Kleinberger et al. vermuten als Ursache eine Störung des Neurotransmitterstoffwechsels durch die Senkung des molaren Verhältnisses zwischen den verzweigtkettigen und den aromatischen Plasmaamino-säuren (Phenylalanin und Tyrosin) (44).

Deshalb sollte bei Entwicklung eines bedrohlichen Zustandsbildes die Anhebung dieses Quotienten durch exogene Zufuhr von L-Valin erwogen werden (44).

Auch bei der hepatischen Encephalopathie wird durch i.v. Zufuhr von L-Valin (42, 43, 44) oder von allen drei VKAS (23, 24, 29, 37, 38, 51, 70) eine Aufhellung des Sensoriums bewirkt. Eine parallellaufende Überwachung der verzweigtkettigen Serumamino-säuren mittels der hier beschriebenen Methode würde die Praktikabilität dieser Therapie entscheidend verbessern.

IV. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit einer neuen Methode zur Bestimmung der verzweigtkettigen Serumamino-säuren.

Dargestellt werden die Präparation des Enzyms Leucin Amino-transferase, die Beschreibung und Standardisierung des enzymatischen Meßverfahrens sowie seine Anwendung bei Normalpersonen und Patienten mit kataboler Stoffwechsellage.

Eine Differenzierung der einzelnen verzweigtkettigen Aminosäuren (Valin, Leucin und Isoleucin) ist mit unserem Verfahren unmöglich. Gegenüber den gebräuchlichen Methoden, die in der Regel chromatographische Trennschritte erfordern, hat es jedoch folgende Vorteile:

- Der Test erlaubt eine unmittelbare Konzentrationsbestimmung, ohne Vorbehandlung des Serums;
- er ist mit den üblichen Photometern in relativ kurzer Zeit durchführbar;
- in Bezug auf Genauigkeit ist er vergleichbar mit säulenchromatographischen und besser als papierchromatographische Verfahren.

Bei der Bearbeitung von Fragestellungen, die bisher chromatographische Methoden zur Bestimmung der verzweigtkettigen Serumamino-säuren erforderten, dürfte das beschriebene enzymatische Meßverfahren daher eine wesentliche methodische Erleichterung sein.

V. Literaturverzeichnis

- (1) Adibi, S.A.:
Influence of dietary deprivations on plasma concentration of free amino acids of man.
J. Appl. Physiol. 25 (1968), 52 - 57

- (2) Adibi, S.A., and A.L. Drash:
Hormone and amino acid levels in altered nutritional states.
J. Lab. Clin. Med. 76 (1970), 722 - 732

- (3) Adibi, S.A.:
Interrelationships between level of amino acids in plasma and tissues during starvation.
Am. J. Physiol. 221 (1971), 829 - 838

- (4) Adibi, S.A., E.L. Morse, and P.M. Amin:
Role of insulin and glucose in the induction of hypoaminoacidemia in man: studies in normal, juvenile diabetic and insuloma patients.
J. Lab. Clin. Med. 86 (1975), 395 - 409

- (5) Aoki, T.T., J.P. Assal, F.M. Manzano, G.P. Kozak, and G.F. Cahill, Jr.:
Plasma and cerebrospinal fluid amino acid levels in diabetic ketoacidosis before and after corrective therapy.
Diabetes 24 (1975), 463 - 467

- (6) Armstrong, M.D., and U. Stave:
A study of plasma free amino acid levels.
II. Normal values for children and adults.
Metabolism 22 (1973), 561 - 569

- (7) Benuck, M., F. Stern, and A. Lajtha:
Transamination of amino acids in homogenates of rat brain.
J. Neurochem. 18 (1971), 1555 - 1567

- (8) Berger, M., H. Zimmermann-Telschow, P. Berchtold, H. Drost, W.A. Müller, F.A. Gries, and H. Zimmermann:
Blood amino acid levels in patients with insulin excess (functioning insulinoma) and insulin deficiency (diabetic ketosis).
Metabolism 27 (1978), 793 - 799

- (9) Bradley, R.F.:
Diabetic ketoacidosis and coma.
In: A. Marble, P. White, R.F. Bradley, and L.P. Krall (eds), Joslin's Diabetes mellitus,
pp. 361 - 416
Lea & Febinger, Philadelphia, 1971
- (10) Carlsten, A., B. Hallgren, R. Jagenburg, A. Svanborg, and L. Werkö:
Amino acids and free fatty acids in plasma in diabetes. I. The effect of insulin on the arterial levels.
Acta Med. Scand. 179 (1966), 361 - 370
- (11) Chaplin, E.R., A.L. Goldberg, and I. Diamond:
Leucine oxidation in brain slices and nerve endings.
J. Neurochem. 26 (1976), 701 - 707
- (12) Clarke, E.F., A.M. Lewis, and C. Waterhouse:
Peripheral amino acid levels in patients with cancer.
Cancer 42 (1978), 2909 - 2913
- (13) Dölp, R., F.W. Ahnefeld und E. Schmitz:
Klinische Untersuchungen über die Konzentration freier Aminosäuren im Plasma und Urin im Postaggressionsstoffwechsel. I. Mitteilung.
Infusionsther. Klin. Ernaehr. 5 (1978), 241 - 245
- (14) Dölp, R., M. Gollwitzer, F.W. Ahnefeld, A. Grünert und E. Schmitz:
Klinische Untersuchungen über die Konzentration freier Aminosäuren im Plasma und Urin im Postaggressionsstoffwechsel. II. Mitteilung.
Infusionsther. Klin. Ernaehr. 5 (1978), 309 - 314
- (15) Feigin, R.D., A.S. Klainer, and W.R. Beisel:
Factors affecting circadian periodicity of blood amino acids in man.
Metabolism 17 (1968), 764 - 775
- (16) Felig, P., O.E. Owen, J. Wahren, and G.F. Cahill, Jr.:
Amino acid metabolism during prolonged starvation.
J. Clin. Invest. 48 (1969), 584 - 594
- (17) Felig, P., T. Pozefsky, E. Marliss, and G.F. Cahill, Jr.:

- Alanine: Key role in gluconeogenesis.
Science 167 (1970), 1003 - 1004
- (18) Felig, P., E. Marliss, J.L. Ohman, and G.F. Cahill, Jr.:
Plasma amino acid levels in diabetic ketoacidosis.
Diabetes 19 (1970), 727 - 729
- (19) Felig, P., and J. Wahren:
Amino acid metabolism in exercising man.
J. Clin. Invest. 50 (1971), 2703 - 2714
- (20) Felig, P., J. Wahren, and G. Ahlborg:
Uptake of individual amino acids by the human brain.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 142 (1973), 230 - 231
- (21) Felig, P.:
The glucose-alanine cycle.
Metabolism 22 (1973), 179 - 207
- (22) Felig, P.:
Amino acid metabolism in man.
Annu. Rev. Biochem. 44 (1975), 933 - 955
- (23) Ferenci, P., J. Funovics and F. Wewalka:
Therapie der hepatalen Enzephalopathie. Beeinflussung des Plasmaaminogrammes durch Aminosäureinfusionen.
Chir. Forum Exp. Klin. Forsch. 95 (1978), 183 - 189
- (24) Ferenci, P., J. Funovics, M. Nimmervoll, H. Pamperl und F. Wewalka:
Beeinflussung veränderter Plasmaamino-säurenspiegel bei Lebercirrhotikern durch verschiedene Aminosäureinfusionen.
In: F. Wewalka und B. Dragosics (Hrsg.), Aminosäuren, Ammoniak und hepatische Encephalopathie, Stoffwechsel-aktuelle Grundlagen-Therapie, S. 195 - 199
Fischer, Stuttgart, 1978
- (25) Fernstrom, J.D., and R.J. Wurtman:
Brain serotonin content: physiological regulation by plasma neutral amino acids.
Science 178 (1972), 414 - 416
- (26) Fernstrom, J.D., R.J. Wurtman, B. Hammarstrom-Wiklund, W.M. Rand, H.N. Munro, and C.S. David-

son:

Diurnal variations in plasma concentrations of tryptophan, tyrosine, and other neutral amino acids: effect of dietary protein intake.
Am. J. Clin. Nutr. 32 (1979), 1912 - 1922

- (27) Fischer, J.E., N. Yoshimura, A. Aguirre, J.H. James, M.G. Cummings, R.M. Abel, and F. Deindorfer:
Plasma amino acids in patients with hepatic encephalopathy. Effects of amino acid infusions.
Am. J. Surg. 127 (1974), 40 - 47
- (28) Fischer, J.E., J.M. Funovics, A. Aguirre, J.H. James, J.M. Keane, R.J.C. Wesdorp, N. Yoshimura, and T. Westman:
Role of plasma amino acids in hepatic encephalopathy.
Surgery 78 (1975), 276 - 290
- (29) Fischer, J.E., H.M. Rosen, A.M. Ebeid, J.H. James, J.M. Keane, and P.B. Soeters:
The effect of normalization of plasma amino acids on hepatic encephalopathy in man.
Surgery 80 (1976), 77 - 91
- (30) Förster, H. und H. Mehnert:
Kohlenhydratstoffwechsel.
In: W. Siegenthaler (Hrsg.), Klinische Pathophysiologie, S. 34 - 99,
Georg Thieme, Stuttgart, 1976
- (31) Galante, A., F. Angelico, G. Crocchioni, and V. Pennetti:
Intersexual differences in the serum-free amino acid pattern of young adults, normal and obese aged subjects.
Nutr. Metab. 22 (1978), 119 - 126
- (32) Gibson, C.J., and R.J. Wurtman:
Physiological control of brain catechol synthesis by brain tyrosine concentration.
Biochem. Pharmacol. 26 (1977), 1137 - 1142
- (33) Gibson, C.J., and R.J. Wurtman:
Physiological control of brain norepinephrine synthesis by brain tyrosine concentration.
Life Sci. 22 (1978), 1399 - 1405
- (34) Goldberg, A.L., and R. Odessey:
Oxidation of amino acids by diaphragms from fed and fasted rats.

Am. J. Physiol. 223 (1972), 1384 - 1391

- (35) Hahn, K., H.A. Ladner und H.J. Jesdinsky:
Konzentrationsänderungen freier Aminosäuren im
Blutplasma von Strahlentherapie-Patienten (Un-
ter Berücksichtigung statistischer Ergebnisse).
Strahlentherapie 143 (1972), 386 - 395
- (36) Hall, S.E., J.T. Braaten, J.B. Mc Kendry, T. Bol-
ton, D. Foster, and M. Berman:
Normal alanine-glucose relationships and their
changes in diabetic patients before and after in-
sulin treatment.
Diabetes 28 (1979), 737 - 745
- (37) Holm, E.:
Behandlung mit Aminosäuren bei hepatischer Ence-
phalopathie,
Fischer, Stuttgart, 1976
- (38) Holm, E., R. Fiene, J.P. Striebel, P. Haux und J.
Kirchmeier:
Spontane und infusionsabhängige Konzentrationen
der Plasmaamino-säuren bei Leberinsuffizienz. Bio-
chemische Daten und EEG.
In: F. Wewalka und B. Dragosics (Hrsg.), Amino-
säuren, Ammoniak und hepatische Encephalopathie,
Stoffwechsel-aktuelle Grundlagen-Therapie,
S. 176 - 191
Fischer, Stuttgart, 1978
- (39) Hutschenreiter, G., W. Neubrand und M. Marberger:
Parenterale Ernährung nach Harnableitungsopera-
tion in den Dickdarm: Stickstoffbilanz, freie
Aminosäuren im Plasma und Eiweißstatus.
Infusionsther. Klin. Ernaehr. 5 (1978), 134 -
140
- (40) Jahnke, K.:
Coma diabeticum.
In: K. Oberdisse (Hrsg.), Handbuch der Inneren
Medizin, Bd. VII, Teil 2 B, S. 605 - 708,
Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 1977
- (41) Katz, N.R. und M. Keck:
Vergleich von Aminosäuren in menschlichem Serum
und Plasma.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 15 (1977), 89 -
91
- (42) Kleinberger, G., P. Ferenci, H. Pall, M. Pichler,
H. Lochs und A. Gassner:

Die Beeinflussung der hepatischen Encephalopathie durch L-Valin.
In: F. Wewalka und B. Dragosics (Hrsg.), Aminosäuren, Ammoniak und hepatische Encephalopathie, Stoffwechsel-aktuelle Grundlagen-Therapie, S. 207 - 212,
Fischer, Stuttgart, 1978

- (43) Kleinberger, G.:
Parenterale Ernährung beim Coma hepaticum.
In: N. Zöllner (Hrsg.), Parenterale Ernährung, Bd. 1, Beiträge zur Infusionstherapie, S. 200 - 221,
Karger, Basel, 1978
- (44) Kleinberger, G., P. Ferenci, A. Gaßner, M. Pichler und H. Lochs:
Unterschiede im Plasmaaminogramm bei Coma hepaticum und Coma diabeticum.
Z. Gastroenterol. 16 (1978), 752 - 759
- (45) Knauff, H.G., G. Mayer und F. Drücke:
Studien zur Verwertung parenteral zugeführter Aminosäurelösungen.
Klin. Wochenschr. 44 (1966), 929 - 943
- (46) Landaas, S.:
Inhibition of branched-chain amino acid degradation by ketone bodies.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 37 (1977), 411 - 418
- (47) Mallette, L.E., J.H. Exton, and C.R. Park:
Effects of glucagon on amino acid transport and utilization in the perfused rat liver.
J. Biol. Chem. 244 (1969), 5724 - 5728
- (48) Marliss, E.B., T.T. Aoki, R.H. Unger, J.S. Soeldner, and G.F. Cahill, Jr.:
Glucagon levels and metabolic effects in fasting man.
J. Clin. Invest. 49 (1970), 2256 - 2270
- (49) Millward, D.J.:
Protein turnover in skeletal muscle. II. The effect of starvation and a protein-free diet on the synthesis and catabolism of skeletal muscle proteins in comparison to liver.
Clin. Sci. 39 (1970), 591 - 603
- (50) Milsom, J.P., M.Y. Morgan, and S. Sherlock:
Factors affecting plasma amino acid concentra-

- tions in control subjects.
Metabolism 28 (1979), 313 - 319
- (51) Munro, H.N., J.D. Fernstrom, and F.J. Wurtman:
Insulin, plasma amino acid imbalance and hepatic coma.
Lancet I (1975), 722 - 724
- (52) Odessey, R., E.A. Khairallah, and A.L. Goldberg:
Origin and possible significance of alanine production by skeletal muscle.
J. Biol. Chem. 249 (1974), 7623 - 7629
- (53) Owen, O.E., A.P. Morgan, H.G. Kemp, J.M. Sullivan, M.G. Herrera, and G.F. Cahill, Jr.:
Brain metabolism during fasting.
J. Clin. Invest. 46 (1967), 1589 - 1595
- (54) Owen, O.E., P. Felig, A.P. Morgan, J. Wahren, and G.F. Cahill, Jr.:
Liver and kidney metabolism during prolonged starvation.
J. Clin. Invest. 48 (1969), 574 - 583
- (55) Pardridge, W.M.:
Kinetics of competitive inhibition of neutral amino acid transport across the blood-brain barrier.
J. Neurochem. 28 (1977), 103 - 108
- (56) Peitsch, W., K. Zürcher und H.D. Becker:
Das Verhalten der freien Aminosäuren im Serum und ihre Urinausscheidung nach ausgedehnten abdominalen Operationen.
Infusionsther. Klin. Ernaehr. 5 (1978), 230 - 235
- (57) Peters, J.H., S.C. Lin, B.J. Ferridge, Jr., J.G. Cummings, and W.R. Chao:
Amino acids, including asparagine and glutamine, in plasma and urine of normal human subjects.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 131 (1969), 281 - 288
- (58) Petrides, P.E.:
Aminosäuren und Polyaminosäuren (Proteine).
In: H.A. Harper, G. Löffler, P.E. Petrides und L. Weiss (Hrsg.), Physiologische Chemie, S. 95 - 145,
Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 1975
- (59) Petrides, P.E.:

Stoffwechsel der Aminosäuren.

In: H.A. Harper, G. Löffler, P.E. Petrides und
L. Weiss (Hrsg.), Physiologische Chemie, S. 400
- 445,

Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 1975

- (60) Pozefsky, T., P. Felig, J.D. Tobin, J.S. Soeldner, and G.F. Cahill, Jr.:
Amino acid balance across tissues of the forearm in postabsorptive man. Effects of insulin at two dose levels.
J. Clin. Invest. 48 (1969), 2273 - 2282
- (61) Pozefsky, T., and R.G. Tancredi:
Effects of intrabrachial arterial infusion of pyruvate on forearm tissue metabolism.
J. Clin. Invest. 51 (1972), 2359 - 2369
- (62) Pozefsky, T., R.G. Tancredi, R.T. Moxley, J. Dupre, and J.D. Tobin:
Effects of brief starvation on muscle amino acid metabolism in nonobese man.
J. Clin. Invest. 57 (1976), 444 - 449
- (63) Rosen, H.M., N. Yoshimura, J.M. Hodgman, and J. E. Fischer:
Plasma amino acid patterns in hepatic encephalopathy of differing etiology.
Gastroenterology 72 (1977), 483 - 487
- (64) Ruderman, N.B.:
Muscle amino acid metabolism and gluconeogenesis.
Annu. Rev. Med. 26 (1975), 245 - 258
- (65) Sachs, L.:
Angewandte Statistik-Planung und Auswertung-Methoden und Modelle.
Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 1973
- (66) Scally, M.C., I. Ulus, and R.J. Wurtman:
Brain tyrosine level controls striatal dopamine synthesis in haloperidol-treated rats.
J. Neural Transm. 41 (1977), 1 - 6
- (67) Schaeffer, G., N. Katz, A. Südhoff, W. Zimmermann und R. Kluthe:
Über die Bedeutung des E/T-Quotienten bei der parenteralen Ernährung.
Akt. Ernährung. 1 (1977), 29 - 33
- (68) Simmons, W.K.:
The plasma amino acid ratio as an indicator of

- the protein nutrition status: A review of recent work.
Bull. WHO 42 (1970), 480 - 484
- (69) Smith, S.R., T. Pozefsky, and M.K. Chhetri:
Nitrogen and amino acid metabolism in adults with protein-calorie malnutrition.
Metabolism 23 (1974), 603 - 618
- (70) Soeters, P.B., and J.E. Fischer:
Insulin, glucagon, amino acid imbalance and hepatic encephalopathy.
Lancet II (1976), 880 - 882
- (71) Soupart, P.:
Free amino acids of blood and urine in the human. In: J.T. Holden (ed.), Amino acid pools, pp. 220 - 262,
Elsevier, Amsterdam, 1962
- (72) Taylor, R.T., and W.T. Jenkins:
Leucine aminotransferase I. Colorimetric assays. J. Biol. Chem. 241 (1966), 4391 - 4395
- (73) Taylor, R.T., and W.T. Jenkins:
Leucine aminotransferase II. Purification and characterization. J. Biol. Chem. 241 (1966), 4396 - 4405
- (74) Troll, U., G. Kessler und G. Schöntag:
Aminosäuren in der parenteralen Ernährung I. Zur Normalverteilung der Serumamino-säuren Stoffwechselgesunder.
Infusionsther. Klin. Ernaehr. 5 (1978), 66 - 68
- (75) Troll, U., G. Schöntag und G. Kessler:
Serumamino-säurespiegel bei aminosäurefreier parenteraler Ernährung. Untersuchungen an chirurgischen Intensivpatienten.
Prakt. Anaesth. 13 (1978), 169 - 174
- (76) Unger, R.H.:
Alpha- and beta-cell interrelationships in health and disease.
Metabolism 23 (1974), 581 - 593
- (77) Wahren, J., L. Hagenfeldt, and P. Felig:
Splanchnic and leg exchange of glucose, amino acids, and free fatty acids during exercise in diabetes mellitus.
J. Clin. Invest. 55 (1975), 1303 - 1314

- (78) Wannemacher, R.W., R.S. Pekarek, P.J. Bartelloni, R.T. Vollmer, and W.R. Beisel:
Changes in individual plasma amino acids following experimentally induced sand fly fever virus infection.
Metabolism 21 (1972), 67 - 76
- (79) Wannemacher, R.W.:
Key role of various individual amino acids in host response to infection.
Am. J. Clin. Nutr. 30 (1977), 1269 - 1280
- (80) Woolf, L.I., J.P. Moore, A.C. Groves, and J.H. Duff:
Arterial plasma amino acids during the first week following femoral shaft fracture.
J. Trauma 19 (1979), 244 - 247
- (81) Wurtman, R.J., F. Larin, S. Mostafapour, and J.D. Fernstrom:
Brain catechol synthesis: control by brain tyrosine concentration.
Science 185 (1974), 183 - 184
- (82) Young, V.R., L.N. Haverberg, C. Bilmazes, and H.N. Munro:
Potential use of 3-methylhistidine excretion as an index of progressive reduction in muscle protein catabolism during starvation.
Metabolism 22 (1973), 1429 - 1436
- (83) Zimmermann-Telschow, H., L. Herberg, F.A. Gries, H. Bethge und H. Zimmermann:
Über die Veränderung von Aminosäuren, Blutzucker, Glucocorticoiden, freien Fettsäuren und freiem Glycerin im Plasma nach Insulininjektion mit und ohne Infusion von Aminosäuren.
Klin. Wochenschr. 47 (1969), 651 - 668
- (84) Zimmermann-Telschow, H. und H. Müller-Wecker:
Beziehungen zwischen Stickstoff-Bilanz und Aminosäuren, freien Fettsäuren, Glucose und Insulin im Blut in verschiedenen Stoffwechselsituationen des menschlichen Organismus.
Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 357 (1976);
695 - 706

VI. Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn Professor Dr. O. Wieland, der mir das Thema anvertraut hat und der mir großzügige Unterstützung gewährte. Seine zahlreichen Anregungen wirkten sich überaus fruchtbar auf die Entwicklung der Untersuchung aus.

Zu großem Dank verpflichtet bin ich auch Herrn Dr. K. Gerbitz, der mir bei dieser Arbeit stets fachmännischen Beistand leistete. Für seine oftmals in Anspruch genommene Hilfe möchte ich ihm herzlich danken.

Herrn Dr. G. Michal verdanke ich die grundlegende Methodik des beschriebenen enzymatischen Meßverfahrens. Erst seine Vorarbeit ermöglichte das Entstehen der vorliegenden Untersuchung.

Für die Überlassung der bei der Fastenstudie gewonnenen Blutseren danke ich Herrn Priv. Doz. Dr. M. Haslbeck. Weiterhin möchte ich meinen Dank aussprechen Herrn Professor Dr. G. Dietze für die Durchführung des Belastungsversuchs am Fahrrad-Ergometer und den Assistenzärzten der Medizinischen Kliniken des Krankenhauses München-Schwabing für die Unterstützung bei der Auswahl von Patienten in kataboler Stoffwechsellage.

Frau Dr. M. Tüma danke ich für die Erstellung eines Computerprogramms, das mir bei der Literatursuche sehr hilfreich war.

Für die Anleitung bei der Präparation der Leucin Amino-transferase danke ich Herrn T. Siklosi.

Schließlich sei auch allen gedankt, die durch Ratschläge, Diskussion und Kritik den Umfang dieser Studie vermehrten.

Hans-Joachim Rudolph

VII. Lebenslauf

13. Dezember 1950 Geburt als erster Sohn des selbständigen Kunstglasermeisters Heinz Rudolph und seiner Ehefrau Eleonore, geborene Beisert, in Quedlinburg/Sachsen-Anhalt.
- April 1957 Eintritt in die Grundschule in Denkingen bei Eßlingen/Baden-Württemberg.
- September 1961 Eintritt in das Alexander-von-Humboldt-Gymnasium in Schweinfurt/Bayern.
- Juni 1970 Abschluß der Schulzeit mit der Erlangung des Reifezeugnisses am genannten Gymnasium.
- Oktober 1970
bis März 1974 Vorbereitende Studien der Philosophie, der Mathematik und der Kunstgeschichte an den Universitäten in Würzburg und Göttingen.
- Seit April 1974 Studium der Humanmedizin an den Universitäten in Würzburg, Berlin und München; Praktisches Jahr an der Medizinischen Klinik Innenstadt (Direktor: Prof.Dr. E. Buchborn), an der Chirurgischen Klinik Großhadern (Direktor: Prof.Dr. G. Heberer) und am Hauner'schen Kinderspital (Direktor: Prof.Dr. K. Betke).
- Mai 1980 Approbation als Arzt.

